



**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular**

**O TRIBUTILESTANHO INDUZ ANORMALIDADES NO TECIDO ADIPOSEO  
MAMÁRIO E ATROFIA GLANDULAR MAMÁRIA EM RATAS**

**CHARLES SANTOS DA COSTA**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Vitória, fevereiro de 2019**

**CHARLES SANTOS DA COSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profº. Dr. Jones Bernardes Graceli.

**Vitória - ES**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me guiar até aqui, por sempre me mostrar o caminho, mesmo que por enigmas ou por caminhos que eu não tinha certeza se dariam em algo ou não, por sempre estar lá (em todos os lugares e em algumas pessoas também) para me ouvir e me aconselhar.

A minha **Família**, especialmente minha avó **Penha** (que na verdade chamo de **mãe** por ter me criado desde bebê) e ao meu **irmão, Eric**, por me apoiarem mesmo que de longe, por orar e acreditar em mim, por suportar e entender meus sumiços, minha demora para ir vê-los ou até mesmo para fazer uma ligação e ver se estava tudo certo. Obrigado por fazer parte da minha vida e por serem minha base, me permitindo correr atrás dos meus sonhos e chegar até aqui.

A minha namorada **Fernanda**, por tentar ter paciência comigo, entender minha ausência, e que eu faço isso (mestrado) pois amo estar onde estou, que as vezes gosto do silêncio para refletir melhor, e de um pouco de solidão para que eu seja minha própria companhia. Obrigado por todo o carinho e cuidados, pelo seu abraço, por estar sempre lá quando precisei, por acreditar em mim, e enxergar uma pessoa boa, com capacidade e talentos que nem mesmo eu consigo enxergar.

A minha amiga e irmã **Evellyn**, por me apoiar em tudo, por acreditar em mim, pelas nossas trocas de palhaçadas que tanto nos fizeram rir, e com certeza ajudaram um ao outro a superar momentos difíceis ao longo do mestrado. Pelas nossas conversas, todos os conselhos e os incontáveis: - Calma, vai dar certo! Que dissemos um ao outro. Obrigado por todo o carinho que tem por mim e como sabe bem, é recíproco.

Aos amigos do **Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular (LETC)** por me receberem tão bem e me ajudarem em tudo, por todo o ensinamento pessoal e profissional, pelas risadas e conversas, experimentos realizados com sucesso ou nem tanto sucesso assim. Ao meu irmão colombiano **Oscar** por ser parceiro em todos os momentos, sempre solícito e carismático. Ao **Eduardo** por sua disciplina e exemplo de pessoa, sempre disposto a ajudar e contribuir com seus conhecimentos, obrigado por todo apoio. Ao amigo **Tiago** (Tiagão), por estar sempre disposto a ajudar e pelo humor que contagia a todos. Ao **Leandro**, que apesar de não estar mais no laboratório hoje, contribuiu muito enquanto esteve, me ajudando e ensinando no primeiro ano de mestrado, sendo também para mim uma referência de pessoa. A **Júlia e Priscila**, que apesar do pouco tempo de contato contribuíram mesmo assim, além de me receberem muito bem. A **Neuza** por sempre estar por perto e ser nossa companheira de

laboratório. As atuais novas ICs **Gabriela, Flávia e Maria Eduarda** por acreditarem no time **LETC**.

Aos demais colegas do mestrado que sempre me trataram com respeito e de certa forma contribuíram para meu desenvolvimento. Por todos os momentos de aprendizado e de diversão também, como as tardes na **varanda** e o **Curso de Férias 2018**. E aos amigos que mesmo fora da UFES fizeram parte desse momento, sempre me animando e dando aquela força independentemente da distância.

A **todos professores** por toda contribuição acadêmica e pessoal, por todas as incríveis aulas teóricas, práticas e discussões construtivas, que com certeza serão fundamentais para minha formação como futuro pesquisador e professor.

Ao **professor Jones**, pela oportunidade, pelo acolhimento e por ter depositado sua confiança em mim. Por toda a ajuda na escrita da dissertação e do artigo e por sempre se preocupar com os integrantes do grupo e tratar-nos como uma família.

Aos **Laboratórios Multiusuários de Histotécnicas, Histologia Molecular e Imunohistoquímica** e no **de Análises Biomoleculares**, e os técnicos envolvidos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

As **Ratas** que deram suas vidas para que o trabalho fosse executado, mas sei que as tratei com todo respeito e carinho possível.

A **UFES, CAPES, FAPES e CNPQ** pelo apoio financeiro e por todas as oportunidades acadêmicas que o mesmo proporcionou.

📌 passo que você dá não precisa ser grande,  
ele só precisa te levar na direção certa. 📌

*Jemma Simmons*

## RESUMO

O tributilestanho (TBT) é um obesogênico associado com diversas complicações. Contudo, poucas investigações têm avaliado os efeitos do TBT em glândulas mamárias (GMs) de ratas adultas. Nesta investigação, nós avaliamos se os efeitos obesogênicos do TBT resultam em anormalidades e expansão do tecido adiposo mamário. TBT foi administrado em ratas, e a morfofisiologia mamária foi avaliada. Além disso, avaliamos a expressão proteica de PPAR $\gamma$ , ER $\alpha$  e aromatase, bem como parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e fibrose. Observamos desenvolvimento morfológico anormal, como reduzido número de botões terminais (*terminal end buds*-TEBs), terminais alveolares (AB), lóbulos e escore de diferenciação (DF) nas ratas TBT. Essas, obtiveram acúmulo anormal na camada de gordura, como evidenciado pelo aumento no número de adipócitos hipertróficos, níveis de triglicerídeos e expressão de PPAR $\gamma$ . Uma forte correlação negativa entre os marcadores obesogênicos mamários e número de TEBs, AB e DF foi observada. Uma correlação positiva foi observada entre os marcadores adipogênicos e inflamação. Elevada expressão proteica de ER $\alpha$  e aromatase foram observadas. Estresse oxidativo e fibrose foram observadas nas ratas TBT. Além disso, uma correlação positiva foi observada entre os marcadores obesogênicos da GM e estresse oxidativo. Portanto, esses dados sugerem que os efeitos obesogênicos do TBT levam a irregularidades na GM de ratas adultas.

**Palavras-chave:** Cloreto de tributilestanho, desreguladores endócrinos, tecido adiposo mamário, atrofia, anormalidades.

## ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an obesogen associated with several complications. However, few investigations have evaluated TBT effects on adult mammary glands (MG). In this investigation, we assessed whether TBT's obesogenic effects resulted in abnormal MG fat pad expansion and other irregularities. TBT was administered to female rats, and their MG morphophysiological development was assessed. We further assessed the MG fat pad for PPAR $\gamma$ , ER $\alpha$ , and aromatase protein expression, as well as inflammation, oxidative stress (OS) and fibrosis. Irregular MG morphological development such as lower TEB number, alveolar (AB), lobule and differentiation (DF) escore were observed in TBT rats. TBT rats had abnormal MG fat accumulation as evidenced by increased numbers of hypertrophic adipocytes, triglyceride (TG) levels and PPAR $\gamma$  expression. A strong negative correlation between the MG obesogenic makers and TEB number, AB and DF escore were observed in TBT rats. MG inflammation was observed in TBT rats. A positive correlation between the MG obesogenic markers and inflammation were observed. High ER $\alpha$  and aromatase expression were observed in MG of TBT rats. MG OS and fibrosis were present in the TBT rats. Additionally, a positive correlation between the MG obesogenic markers and OS were observed in TBT rats. Thus, these data suggest that obesogenic TBT effects led to MG irregularities in the adult female rats.

**Keywords:** Tributyltin chloride, endocrine-disrupting chemicals, mammary gland fat pad, inflammation, atrophy, abnormalities.

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	O Sistema Reprodutor Feminino.....	15
1.2	Regulação hormonal.....	16
1.3	Ciclo reprodutivo de ratas.....	16
1.4	A Glândula Mamária.....	19
1.5	Patologias e Modelos de Estudo.....	23
1.6	Desreguladores endócrinos.....	24
1.7	Organoestânicos.....	26
<b>2.0</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	Animais.....	35
4.2	Análise do ciclo estral.....	35
4.3	Análise histológica, morfometria e histoquímica.....	35
4.3.1	Preparação e análise de <i>whole mount</i> .....	35
4.3.2	Histomorfometria da GM e do tecido adiposo mamário.....	36
4.3.3	Contagem de mastócitos.....	37
4.3.4	Depósito de colágeno.....	37
4.4	Avaliação de triglicerídeo do tecido mamário.....	37
4.5	Processamento das amostras para dosagem de MPO e NAG.....	37
4.6	Avaliação da atividade de MPO (Mieloperoxidase) – Presença de neutrófilos. 38	
4.7	Avaliação da atividade de NAG (N-acetil-β-D-glicosaminidase) – Presença de macrófagos.....	38
4.8	Análise de espécies reativas de oxigênio.....	39
4.9	Determinação de peroxidação lipídica mamária – TBARS (Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico).....	39
4.10	Determinação da concentração de glutatona reduzida – GSH.....	39
4.11	Análise de expressão proteica da GM por Western blot.....	40
4.12	Análise Estatística.....	42
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1	A exposição ao TBT alterou os pesos de ovário e útero, mas não o peso corporal.....	43
5.2	Ratas expostas ao TBT apresentaram alterações no ciclo estral.....	44
5.3	As GMs das ratas expostas ao TBT apresentaram maior massa adiposa e aumento de peso.....	45



5.4	As GMs das ratas expostas ao TBT apresentaram anormalidades morfológicas.....	46
5.5	Ratas expostas ao TBT apresentaram hipertrofia do tecido adiposo mamário e elevação do triglicerídeo tecidual e da expressão de PPAR $\gamma$ . ....	47
5.6	TBT aumentou a expressão de ER $\alpha$ e CYP19 na GM. ....	49
5.7	Ratas expostas ao TBT apresentaram perfil inflamatório elevado. ....	50
5.8	As GMs das ratas expostas ao TBT obtiveram aumento no estresse oxidativo. ....	52
5.9	Exposição ao TBT induziu aumento na deposição de colágeno e na expressão de COL1A1 e COL3A1.....	53
5.10	Análise de correlação entre os parâmetros morfométricos, adipogênicos, inflamação, estresse oxidativo e fibrose. ....	55
<b>6.0</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7.0</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>8.0</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da variação hormonal ao longo do ciclo estral e a celularidade do esfregaço vaginal.....	18
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do desenvolvimento embrionário em camundongos.....	20
<b>Figura 3.</b> Desenvolvimento mamário após o nascimento.....	21
<b>Figura 4.</b> Captura de tela mostrando anúncio de venda de tintas a base de TBT. ....	29
<b>Figura 5.</b> Captura de tela mostrando anúncio de venda de TBTCI no site CESBRA.....	30
<b>Figura 6:</b> Análise do peso dos órgãos reprodutivos e corporal. ....	43
<b>Figura 7:</b> Avaliação do ciclo estral.....	44
<b>Figura 8:</b> Dissecção abdominal representativa da GM.....	45
<b>Figura 9:</b> Análise morfométrica das GMs pela técnica <i>whole mount</i> . ....	47
<b>Figura 10:</b> Análise histomorfológica das GMs. ....	49
<b>Figura 11:</b> Análise da expressão proteica de ER $\alpha$ e CYP19 na GM. ....	50
<b>Figura 12:</b> Análise do perfil inflamatório das GMs. ....	52
<b>Figura 13:</b> Análise do estresse oxidativo das GMs.....	53
<b>Figura 14:</b> Análise do estresse oxidativo das GMs.....	55
<b>Figura 15:</b> Correlação entre marcadores adipogênicos, morfológicos, expressão proteica de CYP19 e ER $\alpha$ .....	58
<b>Figura 16.</b> Correlação entre marcadores adipogênicos, inflamação, estresse oxidativo, fibrose e expressão proteica de CYP19 and ER $\alpha$ .....	59

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Anticorpos usados na avaliação da expressão proteica ..... 41

**Tabela 2:** Resumo das alterações causadas na GM por ação dos OTs..... 61

## LISTA DE SIGLAS

<b>AB1</b>	Terminal alveolar 1
<b>AB2</b>	Terminal alveolar 2
<b>ABs</b>	Terminais alveolares
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AREG</b>	Anfiregulina
<b>BMP4</b>	Proteína morfogenética óssea 4
<b>BMPR1A</b>	Receptor da proteína morfogenética óssea tipo 1A
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	Proteína potencializadora de ligação/CCAAT $\beta$
<b>COL1A1</b>	Colágeno $\alpha$ 1 tipo I
<b>COL3A1</b>	Colágeno $\alpha$ 1 tipo III
<b>CON</b>	Controle
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>CYP19</b>	Aromatase
<b>D</b>	Diestro
<b>DBT</b>	Dibutilestanho
<b>DF1</b>	Escore de diferenciação 1
<b>DF2</b>	Escore de diferenciação 2
<b>DHE</b>	Dihidroetideo
<b>DMSO</b>	Dimetilssulfóxido
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
<b>E</b>	Estro

<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>ED1</b>	Antígeno CD68
<b>EDC</b>	<i>Endocrine disrupting chemical</i>
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrogênio $\alpha$
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ESR1</b>	Gene do receptor de estrogênio $\alpha$
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GM</b>	Glândula mamária
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>GP91-phox</b>	Glicoproteína 91-phox
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IMO</b>	Organização Marítima Internacional
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>M</b>	Metaestro

<b>MD</b>	Metaestro-Diestro
<b>MSX2</b>	Gene homeobox Muscle 2
<b>NAG</b>	N-acetil-β-D-glicosaminidase
<b>NBT</b>	nTitroblue tetrazolium chloride
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OTs</b>	Organoestânicos
<b>P</b>	Proestro
<b>PCOS</b>	Síndrome do ovário policístico
<b>PPAR<sub>γ</sub></b>	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
<b>PTHLH</b>	Proteína relacionada ao hormônio paratireoidiano
<b>G</b>	Força G
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TBARS</b>	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TBS</b>	Salina tamponada com TRIS
<b>TBST</b>	Salina tamponada com TRIS e TWEEN
<b>TBT</b>	Tributilestanho
<b>TBTCL</b>	Cloreto de Tributilestanho
<b>TEBs</b>	Botões terminais
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TPT</b>	Trifenilestanho
<b>UFES</b>	Universidade Federal do Espírito Santo

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 O Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutivo feminino é composto anatomicamente pela vulva, sendo esta, a genitália externa feminina. Já a vagina, cérvix, útero, tubas uterinas e ovários são os órgãos internos (KUMAR et al., 2013). Esse conjunto é essencial para o processo reprodutivo e perpetuação das espécies de mamíferos, provendo ambiente favorável à fertilização dos oócitos, implantação e desenvolvimento embrionário (KOBAYASHI; BEHRINGER, 2003). Morfologicamente as glândulas mamárias são um tipo de glândulas cutâneas, mas fisiologicamente, as mesmas podem ser classificadas como glândulas acessórias do sistema reprodutivo feminino (TALANTI; HOPUSU, 1961).

O sistema reprodutivo de um indivíduo é normalmente caracterizado por suas gônadas, no caso do feminino tem-se os ovários, que apresentam o importante papel de maturar e liberar por meio da ovulação, o gameta feminino, o oócito, o qual nas tubas uterinas pode ser fertilizado e carregado até o útero, órgão que recebe o embrião e onde ocorre a nidificação e desenvolvimento do mesmo, permitindo assim, a perpetuação da espécie. Além de atuarem como gônadas, os ovários são glândulas endócrinas, ou seja, produzem e secretam hormônios, mais especificamente os esteroides. Esses por sua vez, são essenciais para reprodução e manutenção do embrião no útero, além de atuar em outros locais como no cérebro, hipófises, tubas uterinas, cérvix, vagina e glândulas mamárias. (HANNON; FLAWS, 2015).

O sistema reprodutivo tem caráter dinâmico, onde a cada ciclo reprodutivo o miométrio uterino passa por remodelamento (hipertrofia e involução), o ovário sofre reparo tecidual após a ovulação e o trato como um todo ganha e perde a capacidade de receber ou não um novo embrião (EDDIE et al., 2014). Cada órgão desse sistema se encontra harmonicamente conectado aos outros por meio de complexas vias de sinalização endócrina, envolvendo hormônios como os esteróides estrogênio e progesterona (YOUNG et al., 2017). E além destes, os não esteróides como FSH e LH, formando assim um eixo de comunicação que tem por função coordenar as modificações do trato reprodutivo como um todo, preparando-o para a reprodução. Essa rede de sinalização e regulação é denominado eixo hipotálamo-hipófise-gônada (ASIMAKOPOULOS, 2012).

## **1.2 Regulação hormonal**

De forma resumida, o eixo hipotálamo-hipófise-gônada é responsável pela regulação dos eventos e modificações do trato reprodutivo ao longo dos ciclos durante a fase reprodutiva dos mamíferos (ASIMAKOPOULOS, 2012). Por meio de estímulos, os neurônios GnRH hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), e este, estimula as células gonadotróficas na hipófise anterior a secretarem na circulação sanguínea, os hormônios gonadotróficos folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que por sua vez regulam a função das gônadas em ambos os sexos (MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013).

As gônadas, como já mencionado, além de estarem envolvidas na produção, desenvolvimento e liberação dos gametas, também tem a função de produzirem hormônios, dentre eles estão os esteroides como estrogênio e progesterona, além de inibinas e activinas que acabam por desempenhar uma sinalização de feedback para os neurônios GnRH, direcionando assim a liberação pulsátil do peptídeo de mesmo nome (GnRH). No entanto, o estrogênio, tem importante papel na regulação do eixo, sendo um dos principais reguladores desses neurônios ao longo dos ciclos reprodutivos (ASIMAKOPOULOS, 2012; MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013).

## **1.3 Ciclo reprodutivo de ratas**

Como o modelo utilizado neste trabalho trata-se de um modelo roedor, se faz importante compreender um pouco a dinâmica de seu ciclo reprodutivo. O ciclo reprodutivo dos roedores é denominado ciclo estral, sendo caracterizado pelas modificações morfológicas que ocorrem no trato reprodutivo das fêmeas, com um tempo de duração bem menor que os 28 dias observados em humanos saudáveis, normalmente entre 4 e 5 dias (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005).

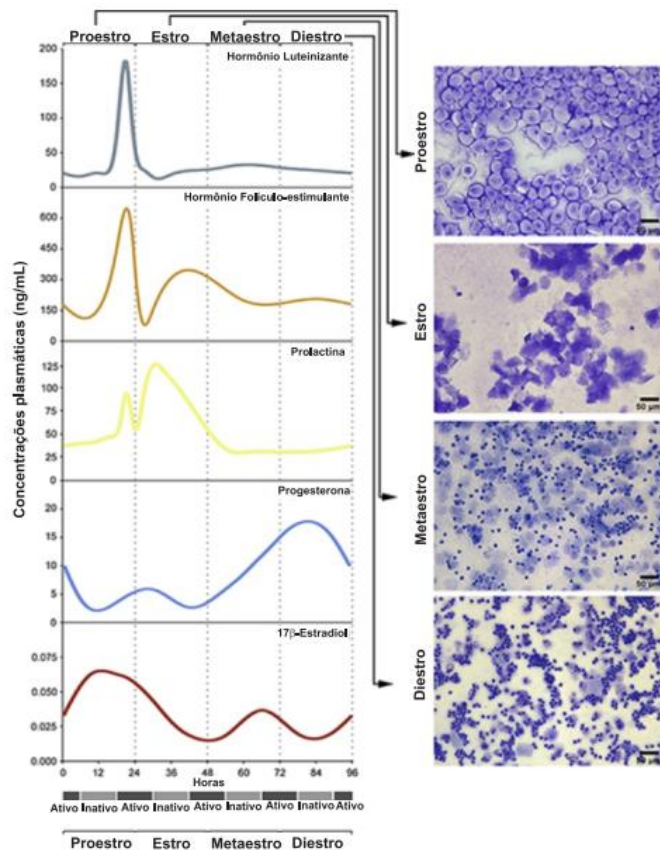
As fêmeas de roedores são poliestricas, e possuem um ciclo estral sucessivo e regular, sendo este, dividido em quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, estas fases normalmente podem ser identificadas via análise do esfregaço vaginal (WESTWOOD, 2008).



As modificações estruturais no epitélio vaginal durante o ciclo, são induzidas pela ação do estrogênio e da progesterona, assim sendo, a vagina pode ser comparada com um “espelho” da função ovariana, refletindo desta forma, a atividade dos hormônios sexuais liberados pela gônada feminina. Portanto, as características qualitativas e quantitativas das células presentes no esfregaço vaginal, são sugestivas da fase do ciclo em que animal em estudo se encontra (PACCOLA et al., 2013).

A fase de proestro (duração de 12-14 horas) corresponde a fase folicular do ciclo menstrual humano, esta fase é a pré-ovulatória, com altos níveis circulantes de  $17\beta$ -estradiol e uma pequena elevação da prolactina, nesta etapa do ciclo, o epitélio vaginal, compreende de 9-12 camadas de células, tendo as mais maduras na superfície, é caracterizado por esfregaço vaginal com predominância de células arredondadas e nucleadas. O aumento de  $17\beta$ -estradiol estimula a liberação de GnRH e consequentemente a liberação de FSH e LH na circulação, estimulando a ovulação na fase de estro (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005; MCLEAN et al., 2012).

A próxima fase, o estro (25-27 horas), há a queda nos níveis de  $17\beta$ -estradiol circulante e a prolactina por sua vez, é elevada. Seu esfregaço distingue-se pela presença de células irregulares e anucleadas cornificadas. Já na entrada da fase de metaestro (6-8 horas), coincide com uma contínua elevação da progesterona e corresponde ao início da fase lútea. A progesterona sérica começa a aumentar e há uma discreta elevação do  $17\beta$ -estradiol em resposta a ativação do corpo lúteo. Nessa fase, a parede vaginal apresenta infiltrado de leucócitos na camada epitelial que já se encontra mais delgada, devido a uma queda nos níveis de estrogênio. Por fim, o diestro (55-57 horas), o corpo lúteo começa a reduzir a liberação de progesterona, o epitélio vaginal se apresenta na sua forma mais delgada, a partir deste ponto, a degeneração epitelial cessa, e este recomeça a crescer graças a mitose de suas células. Leucócitos predominam no esfregaço vaginal. (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005; MCLEAN et al., 2012) (Figura 1).



**Figura 1. Representação da variação hormonal ao longo do ciclo estral e a celularidade do esfregaço vaginal.** Detalhes no texto; Adaptado de (MCLEAN et al., 2012).

A glândula mamária, apesar de ser uma glândula acessória do trato reprodutivo feminino (TALANTI; HOPSON, 1961), assim como os outros órgãos, também sofre modificações estruturais decorrentes das flutuações hormonais, que visam prepará-la para uma potencial lactação, processo que envolve proliferação, ramificação lateral e diferenciação, mas regride sempre que a gravidez não se estabelece, por meio da involução, processo que depende de apoptose das células epiteliais mamárias (ANDRES; STRANGE, 1999; STRANGE et al., 2007).

#### 1.4 A Glândula Mamária

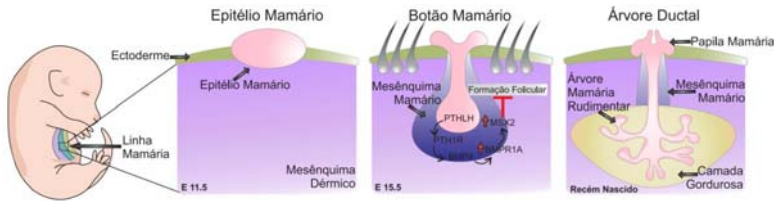
A glândula mamária (GM) é o órgão complexo que produz e secreta o leite, um importante composto lipídico e proteico que confere nutrição e defesa imune aos recém-nascidos. A produção do leite corresponde à uma estratégia de sobrevivência desenvolvida ao longo da evolução, o que permitiu a partir de então, um melhor crescimento, cuidado e desenvolvimento das proles, o que é uma característica única que distingue os mamíferos dos demais animais (KHOKHA; WERB, 2011; MACIAS; HINCK, 2012).

Morfológicamente, a mama é constituída por dois principais compartimentos: o epitelial que dá origem ao sistema de ductos ramificados com botões terminais (TEBs), ou alvéolos nas extremidades, sendo este composto por células epiteliais que durante a embriogênese proliferam-se a partir da papila mamária e avançam sentido à camada de gordura adjacente. O segundo compartimento é o estromal, formado pelo tecido adiposo branco composto por adipócitos, além do infiltrado de células endoteliais vasculares, fibroblastos e células do sistema imune, responsáveis respectivamente, pela irrigação sanguínea, suporte estrutural e defesa imunológica (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2001; INMAN et al., 2015; MACIAS; HINCK, 2012).

Originada da ectoderme e mesoderme, a GM, tem parte do seu desenvolvimento durante o período embrionário, atingindo, no entanto, seu amadurecimento estrutural e funcional no período da lactação. Seu desenvolvimento pode ser dividido em discretas fases, iniciando pela fase embrionária, onde um pequeno brotamento se forma a partir da papila, presente na linha mamária (Figura 2). (CHESNEL et al., 2017; COWIN; WYSOLMERSKI, 2010; MACIAS; HINCK, 2012).

Após o nascimento, fase denominada **pré-puberdade** o recém-nascido possui apenas uma pequena ramificação. A progressão dessa pequena estrutura para uma grande árvore de ductos é reativada na puberdade, graças a ação dos hormônios sexuais que começam a ser produzidos nesse período, como 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) e a progesterona. Vale destacar que mamíferos machos e fêmeas tem similar desenvolvimento mamário até a puberdade, quando seus

hormônios específicos passam a regular e definir o dimorfismo sexual (COUSSENS; POLLARD, 2011; MACIAS; HINCK, 2012; NEED et al., 2014).

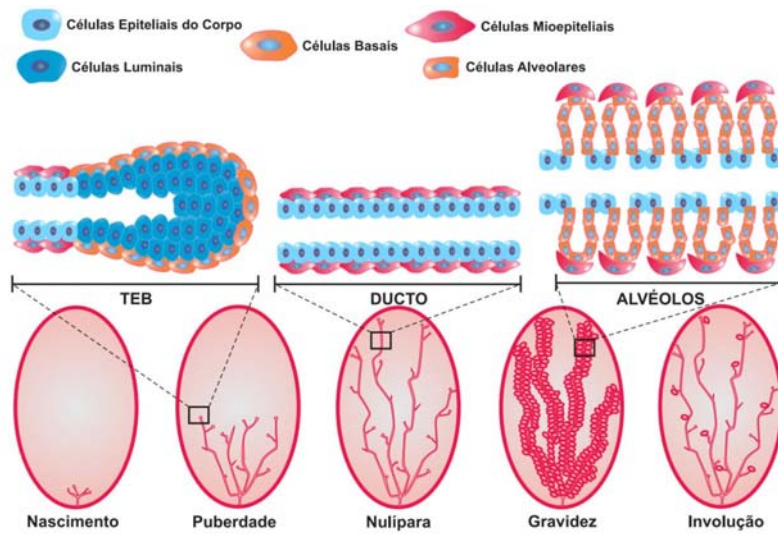


**Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento embrionário em camundongos.** As placas mamárias presentes nas linhas mamárias se multiplicam em uma bola de células que adentram o mesênquima adjacente. A proteína relacionada ao hormônio paratireoideano (PTHLH) liberada pelo epitélio estimula a expressão mesenquimal do receptor BMPR1A. A ligação da proteína mesenquimal BMP4 a esse receptor promove ativação de MSX2 que inibe a formação de folículos capilares na região de desenvolvimento da papila mamária. O epitélio mamário prolifera e se torna uma pequena e simples árvore mamária rudimentar, permanecendo assim até o nascimento (E11.5 e E15.5 <sup>19</sup> dia embrionário); (Baseado em Macias; Hink, 2013).

No **período da puberdade**, há o início dos ciclos ovarianos e sua respectiva produção e oscilação hormonal, e com o estímulo destes hormônios, surgem as estruturas proliferativas denominados botões terminais (TEBs), estes possuem alta atividade de proliferação. Dentre os hormônios ovarianos com atividade mamária, se encontra o estrogênio que induz a elongação dos ductos mamários, ativando os TEBs e a progesterona responsável pela ramificação e crescimento lateral da glândula ativando os terminais alveolares, estruturas que se formam na lateral dos ductos (BRISKEN; ATACA, 2015; CHUA et al., 2010).

Durante a gravidez o epitélio prolifera rapidamente em resposta a um novo e contínuo aumento dos níveis desses hormônios, associados à prolactina. Nesse período, ocorre o desenvolvimento dos alvéolos, constituídos de células secretórias, responsáveis pela produção do leite. É durante a **fase da lactação** que esse órgão alcança seu ápice de desenvolvimento, onde as células alveolares secretam para o lúmen alveolar, e por meio de uma cascata hormonal estimulada pela sucção da papila, as células mioepiteliais que circundam o alvéolo comprimem os ductos até que o leite seja expelido para o meio externo (INMAN et al., 2015). A GM tende a permanecer em seu estado maduro enquanto houver estímulo de amamentação. Entretanto, quando esse

estímulo é interrompido (desmame), a glândula entra na “última” fase, denominada **involução** (2 dias após o desmame), onde as células do epitélio mamário desenvolvido entram em processo de apoptose, e o espaço deixado pelas mesmas é substituído por pré-adipócitos que proliferam em novos adipócitos (LUND et al., 1996; YU; VERHEYEN; ZENG, 2016) (Figura 3).



**Figura 3. Desenvolvimento mamário após o nascimento.** Diversas mudanças ocorrem na glândula mamária ao longo do seu desenvolvimento pós nascimento. Com estímulo hormonal na puberdade o epitélio ductal prolifera ao longo do tecido adiposo. No animal adulto nulípara, a GM possui ramificações laterais que se expandem no compartimento estromal. Na gravidez e lactação essas ramificações proliferam e se desenvolvem em lóbulos e após o desmame tendem a involuir (Baseado em Macias; Hink, 2013).

A GM de um indivíduo adulto do sexo feminino não grávido, sofre modificações moleculares e estruturais ao longo dos ciclos ovarianos, envolvendo frequentes e curtas etapas de desenvolvimento e regressão (HODSON et al., 2013). A relação entre a fase do ciclo ovariano e os vários estágios de desenvolvimento da GM apresenta uma abordagem comum em diversos mamíferos (CHANDRA; CLINE; ADLER, 2010), mesmo que as mudanças morfológicas, composição e complexidade observadas não sejam uniformes entre as espécies (KHOKHA; WERB, 2011).

Exemplos de diferenças entre mamíferos podem ser observadas na GM canina que alcança total diferenciação lobuloalveolar secretória mesmo não estando no período gestacional, isso ocorre durante a fase lútea do ciclo ovariano, que nesses animais é mais prolongada, devido a longa persistência do corpo lúteo. Diferente dos primatas com seus ciclos mensais (CHANDRA; CLINE; ADLER, 2010) ou mesmo roedores cujos ciclos giram em torno de 4-5 dias (HVID et al., 2012). Em mulheres a total diferenciação pode levar muitos anos após a puberdade, e em alguns casos, sem uma gravidez supervisionada, tal evento não se dá por completo (RUSSO; RUSSO, 2004).

A ação dos hormônios sobre a GM se dá desde as fases iniciais de sua formação, ainda no embrião, onde o PTHLH, responsável pela formação da papila mamária e manutenção do mesênquima, o que permite a formação do sistema ductal rudimentar. O hormônio do crescimento (GH) é essencial para o desenvolvimento mamário, entretanto indiretamente, já que a maior parte da sua ação é estimular as células do estroma a produzirem fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) (MACIAS; HINCK, 2012).

O estrogênio tem importância crítica na puberdade, pois junto da IGF-1, regula a morfogênese dos ductos e sua elongação, por meio da estimulação da liberação da anfiregulina (AREG) via ativação do receptor de estrogênio 1 (ESR1) intracelular (PAINE; LEWIS, 2017), que por sua vez estimula o estroma a liberar fatores de crescimento. A progesterona é responsável pela expansão por ramificação lateral e pela alveologênese, por meio de diversas vias, incluindo ativação do receptor ativador do ligante de NFKB1 (RANKL), isso se dá pela ligação desse hormônio ovariano ao seu receptor intracelular PGR1B, com consequente ativação de uma cascata de sinalização (BRISKEN; ATACA, 2015; MACIAS; HINCK, 2012).

A prolactina, é o principal hormônio envolvido na competência de lactação da mama, mas também tem função na alveologênese, e em sinergismo com a sinalização da progesterona via ativação do seu receptor de membrana PRLR participa da cascata de sinais intracelulares que ativam NFKB induzindo a lactogênese (produção do leite) (MACIAS; HINCK, 2012). Outros hormônios também participam ao longo do desenvolvimento, como leptina, testosterona,

cortisol e hormônio tireoidiano T3 (BRISKEN; ATACA, 2015; CAPUCO; CONNOR; WOOD, 2008).

Para o normal crescimento e desenvolvimento da função, a GM depende principalmente de um equilíbrio entre processos celulares como proliferação e apoptose. Desregulações das características celulares e da homeostase da função celular tendem a predispor os animais a patologias e/ou funcionamento anormal das glândulas mamárias (SAPOUCKEY et al., 2018).

### 1.5 Patologias e Modelos de Estudo

As patologias mamárias são resultado de alterações bioquímicas e moleculares que culminam em perda das características normais do tecido, assim como, das suas funções. No microambiente da mama, proteínas celulares, lipídios e DNA estão sujeitos a sofrerem mutações quando expostos a fatores desreguladores oriundos do meio endógeno ou exógeno (LITHGOW, 2005). Fisiologicamente em diversos tipos de tecido, as células por meio de metabolismo aeróbico produzem substâncias chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim como em outros tecidos, na GM níveis normais de EROs são importantes para a homeostase, fazendo parte da regulação na proliferação e migração celular, remodelamento e principalmente na involução (BARATTA et al., 2018).

Contudo, um excesso de EROs e a ausência ou deficiência de agentes antioxidantes causados por um desbalanço na produção dos mesmos, tende a desencadear um evento conhecido como **estresse oxidativo** (BARATTA et al., 2018; ESLAMI et al., 2015). Essa perturbação da homeostase celular leva a danos no DNA, proteínas e lipídios, induzindo as células à morte celular programada (apoptose), à necrose e inflamação, ou à mutações de caráter proliferativo, fatores estes, que são observados em diversas patologias (LITHGOW, 2005; SYAM et al., 2017).

Dentre as principais patologias que afetam as glândulas mamárias se encontram ectasia de ducto, onde ocorrem inflamações e dilatação dos ductos, mastites agudas, necrose gordurosa, alterações fibrocísticas, fibroadenomas, papiloma intraductal, cicatrização radial, doenças proliferativas mamárias como carcinoma de ducto e carcinomas invasivos, entre outros (CARTON, 2012).

O câncer de mama está entre os principais responsáveis por mortes relacionadas a câncer no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). É a forma de câncer mais comum em mulheres, sendo a segunda maior causa de morte por câncer nos indivíduos do gênero na América (OSBORNE; RUDEL; SCHWARZMAN, 2015). Existe grande preocupação com os fatores de risco relacionados às doenças da mama, incluindo drogas, dieta, problemas genéticos, exposição ambiental a contaminantes, exposição ao longo da vida a estrogênios endógenos e compostos estrogênicos, sendo estes as principais causas/fatores de risco de câncer de mama em mulheres (DAVIS; FENTON, 2013a).

Embora existam diferenças biológicas e no desenvolvimento entre animais e humanos, o uso de modelos animais para avaliação da ação de compostos químicos na GM, tem sido necessário e mostrou-se um importante avanço que auxilia no entendimento da biologia e resposta tecidual à injúria e câncer. Como exemplos de modelos temos os espontâneos, camundongos CD1, ratos CD1, *Sprague-Dawley*, *Fisher* ou *Wistar*. Existem também os modelos de engenharia genética, onde camundongos são modificados para superexpressarem ou não expressarem determinados genes relacionados à ativação da carcinogênese e/ou sua modulação e ainda existem os modelos de carcinogênese química, que explora a susceptibilidade das espécies de animais, induzindo-os ao câncer com agentes químicos como os desreguladores endócrinos (DAVIS; FENTON, 2013b).

### **1.6 Desreguladores endócrinos**

O desenfreado desenvolvimento químico-industrial, foi responsável pela geração de inúmeros compostos ao longo dos anos, com o intuito de beneficiar e contribuir para o desenvolvimento humano (KHETAN, 2014). Por outro lado, apesar dos benefícios e retorno financeiro, algumas dessas substâncias utilizadas em larga escala e sem um controle de contenção adequado, podem trazer prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana por meio da sua liberação e exposição inadequada nos ecossistemas (MENG; LIN; LIU, 2009).



O conjunto de moléculas, denominados desreguladores endócrinos (EDC), como sugere o nome, são compostos químicos cujos efeitos principais de sua exposição são alterações na ação normal do sistema endócrino (MACON; FENTON, 2013). Eles alteram a função do sistema, causando consequentemente, efeitos adversos à saúde de um organismo, sua prole ou subpopulações, até então intactos (HEINDEL et al., 2012). São altamente heterogêneos e abrangem drogas sintéticas, pesticidas, produtos de consumo, compostos utilizados no setor industrial, subprodutos e poluentes das indústrias, incluindo alguns metais, e até mesmo substâncias naturais como fitoestrogênios, dentre outros (MANSERVISI et al., 2015).

Esses compostos podem agir diretamente sobre os receptores hormonais, mimetizando hormônios ou antagonizando seus efeitos, independentemente de possuírem potência equivalente ou não. Outros tem ação direta sobre os conjuntos proteicos responsáveis pelo transporte dos hormônios até seus alvos finais. Sua afinidade pode não ser específica, ou seja, pode ter capacidade de interagir com diferentes tipos de receptores, alterando desta forma vários eixos do organismo (HEINDEL et al., 2012). Podem se ligar a receptores nucleares, receptores não nucleares de esteroides como o receptor de estrogênio (ER), receptores não esteroides, como receptores de neurotransmissores, de serotonina, noradrenérgicos e receptores órfãos (DE COSTER; VAN LAREBEKE, 2012).

Alguns exemplos destes compostos são os bisfenóis, como o bisfenol A (BPA) usado na confecção de policarbonatos plásticos e resinas, conhecido por ter afinidade e ativar o ER, sendo ligado a casos de câncer (HINDMAN et al., 2017). Alquilfenóis, como o nonilfenol usado como surfactante, tem ação negativa sobre desenvolvimento mamário (CHAMARD-JOVENIN et al., 2017). O 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina TCDD, oriundo de resíduos da produção de clorofenóis, apresenta prejuízos no metabolismo da glicose (ALONSO-MAGDALENA; QUESADA; NADAL, 2011). Organoestânicos, são organometálicos com grande uso na indústria, como na produção plásticos, pesticidas, estabilizadores e tintas, conhecidos por ter capacidade de desregular eixos endócrinos, inclusive o eixo reprodutivo em vertebrados (DE ARAÚJO et al., 2018a) e invertebrados (COSTA et al., 2017).

### 1.7 Organoestânicos

Sir Edward Frankland (1825-1899), realizou os primeiros estudos sistemáticos sobre os compostos organoestânicos (OTs), com os quais sintetizou diiodeto de dietilestanho e tetraetilestanho, respectivamente nos anos 1853 e 1859. Graças a outras investigações que se seguiram, até os anos 2000, mais de 800 tipos de organoestânicos já eram conhecidos, sendo a maioria de origem antropogênica, excluindo-se apenas os metilestanhos, (HOCH, 2001) que podem ser gerados por bactérias pelo processo conhecido como biometilação (HALLAS; MEANS; COONEY, 1982).

São denominados, OTs, todos aqueles compostos que possuem pelo menos uma ligação entre estanho e carbono, pertencendo por sua vez o segundo elemento, a um grupo orgânico. A química orgânica do estanho é restringida até o estado de oxidação +4. (NICHOLSON, 1989). Compostos mono e diorganoestânicos tinham seu uso direcionado a estabilização de cloreto de polivinila (PVC), revestimentos de vidros e catalisação de reações químicas. Os compostos triorganoestânicos foram largamente utilizados na composição de biocidas e pesticidas, e por final os tetraorganoestânicos foram usados como intermediários na indústria química (APPEL, 2004). Sua produção chegou a alcançar 60.000 toneladas anuais, suprimindo a demanda de suas aplicações na agricultura, indústria e biomedicinais, chegando a ser, alguns de seus compostos, candidatos a quimioterápicos (NATH, 2008).

Em 1950, cientistas holandeses determinaram a atividade biocida dos compostos triorganoestânicos. Notou-se que diferentes tipos de triorganoestânicos afetavam diferentes organismos, e dentre estes compostos, destacou-se o tributilestanho (TBT), sendo considerado o mais tóxico, tendo grande ação contra bactérias Gram-positivas, fungos e uma considerável gama de organismos do meio aquático, esse evento intensificou a produção e utilização desses compostos nesse período (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). O TBT foi considerado o componente anti-incrustante ideal para embarcações, devido a sua efetividade e longa duração, prevenindo desta forma o alto custo com manutenção e tempo de docagem, fazendo com

que a indústria de anti-incrustantes faturasse cerca de 3 bilhões de euros anualmente (SOUSA et al., 2014).

Na França, entre os anos de 1975 e 1982, um considerável prejuízo na reprodução de ostras devido a anomalias envolvendo processos de calcificação em ostras geraram grande perda econômica, estando essa, entre as primeiras evidências de dano ambiental causado pela liberação de organoestânicos provenientes de tintas anti-incrustantes (SONAK, 2009). Com o passar dos anos ocorrências similares se deram em outros países, chamando a atenção de pesquisadores que começaram a reproduzir esses eventos em laboratório, onde observou-se redução na população de moluscos (BEAUMONT; BUDD, 1984; GIBBS; BRYAN, 1986), crustáceos (MEADOR, 1986), de microalgas (BEAUMONT; NEWMAN, 1986), e deficiência no crescimento de mexilhões (SALAZAR; SALAZAR, 1991).

Um dos mais importantes eventos já documentados, a observação do aparecimento de estrutura similar ao órgão masculino em fêmeas do molusco *Nucella lapillus* (BLABER, 1970). O grupo dos OTs, chegou a ser classificado como o terceiro poluente ambiental mais importante, aumentando assim a preocupação com sua bioacumulação no ecossistema e consequentemente no seu papel de contaminante na cadeia trófica, podendo atingir a espécie humana (NATH, 2008).

A sensibilização frente ao indesejado impacto causado pelo TBT, levou à proibição da utilização de tintas contendo esse composto em embarcações de pequeno porte em diversos países (KONSTANTINOU; ALBANIS, 2004). EM 2001, a “*Antifouling Systems Convention*”, foi adotada pela *International Maritime Organization* (IMO) com o intuito de banir a aplicação do TBT em todas as formas de embarcações após janeiro de 2003, e determinar sua não existência na composição dos revestimentos ativos após janeiro de 2008 (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2002; INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, 2001). A adesão à convenção só se tornou internacional após setembro de 2008, com cerca de 25 estados, representando pelo menos 25 % da frota mercante mundial (DAFFORN; LEWIS; JOHNSTON, 2011).

O Brasil foi um dos membros signatários da Convenção, e visando se adequar às exigências normativas, no ano de 2007, por meio da portaria 23 das Normas da Autoridade Marítima, homologou a proibição do uso de tintas anti-incrustantes (DIRETORIA DE PORTOS E COSTAS, 2007). Além dessa normativa, por meio da resolução do CONAMA nº 357 de 2005, foram estabelecidas as concentrações máximas de 10 ng L<sup>-1</sup> de TBT para águas doces do classe I, 63 ng L<sup>-1</sup> para águas doces de classe II, 370 ng L<sup>-1</sup> para águas salinas de classe I e 2000 ng L<sup>-1</sup> para águas salinas de classe II (CONAMA, 2005). E em 2012, por meio da resolução CONAMA nº 454, estabeleceu-se as concentrações máximas de TBT referentes aos sedimentos de águas doces (100 µg Kg<sup>-1</sup>) e de águas salinas e salobras (1000 µg Kg<sup>-1</sup>) (CONAMA, 2012).

Contudo, apesar de importantes essas restrições, as mesmas não apresentam efeito imediato na remoção do TBT, visto que esses compostos ficam retidos nos sedimentos marinhos, e lá permanecem. Além disso, mesmo com o banimento do uso do TBT pelos países associados à IMO, sua produção e utilização tendem a continuar normalmente, sobretudo em países em desenvolvimento e naqueles que não aderiram ao IMO (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Anos após a proibição do uso de tintas contendo OTs em embarcações de pequeno porte, investigações ainda demonstram que há contaminação com altas concentrações de TBT em sedimentos de pequenos portos e na água de lavagem dos cascos na Suécia e Finlândia, sendo as embarcações de lazer uma das principais fontes de liberação no meio ambiente (EKLUND et al., 2009; EKLUND; ELFSTROM; BORG, 2008; LAGERSTRÖM et al., 2017). A detecção de estanho foi usada no rastreamento de OTs em rampas e embarcações abandonadas na Grécia, Malta e Inglaterra, indicando que mesmo com a legislação vigente muitos donos de barcos decidiram não remover o revestimento com as substâncias proibidas, ou fizeram uma incorreta selagem das mesmas (TURNER et al., 2015). Na América do Sul, países como Argentina (DEL BRIO et al., 2016), Brasil (PETRACCO et al., 2015), Chile (BATISTA; CASTRO; FILLMANN, 2016; MATTOS et al., 2017), Equador (GRIMÓN et al., 2016), Peru (CASTRO; FILLMANN, 2012) e

Venezuela (PAZ-VILLARRAGA et al., 2015) ainda continuam a produzir e utilizar o TBT.

A produção de tintas com TBT ainda existe mesmo em países desenvolvidos e signatários da convenção, como os Estados Unidos, onde pelo site Sea Hawk Paints: <https://www.seahawkpaints.com/product/islands-44-plus-harder/> (Figura 4) é possível comprar tintas tendo como base o tributilestanho.

Home / Antifouling Bottom Paints / Export - (Non-US) / Islands 44 Plus™ HARDER

## Islands 44 Plus™ HARDER



WAYS TO BUY

**Available Colors:**

- Black - 1005H
- Dark Blue - 1030H
- Blue - 1002H
- Green - 1234H
- Red - 1001H
- Teal - 1235H

**Overview** Tech Specs Ways To Buy Related Products

**Tin-Based – 1000H Series**

Islands 44 Plus HARDER was developed for the harshest tropical environments in the world. Islands 44 Plus HARDER is a multi-seasonal self-polishing paint. It has a high load of copper and tin that will ensure maximum protection against marine growth. The most popular antifouling paint in the Caribbean, Islands 44 Plus Harder is effective on boats of all types and sizes, including mega yachts.

- ▶ Self-cleaning copolymer with high load of tin (TBT) and copper
- ▶ The only tin (TBT) paint available on the market
- ▶ Highest level of antifoulant protection available
- ▶ Highest quality grade of cuprous oxide available (more potent active ingredient)

*This product may not be sold or applied in the United States. Please check with your respective Country for regulatory requirements regarding sale and use of the product.*

Categories: [Antifouling Bottom Paints](#), [Export - \(Non-US\)](#), [Searchable](#)

**Figura 4. Captura de tela mostrando anúncio de venda de tintas a base de TBT. Disponível em: <https://www.seahawkpaints.com/product/islands-44-plus-harder/> Acessado em: 18/12/2018.**

No Brasil pode-se ter acesso livre ao cloreto de tributilestanho (TBTCI) como observado no site: <https://2122-br.all.biz/o-cloreto-de-tri-butil-estanho-tbtcl-cesbra-q3678> (Figura 5), onde há até mesmo a indicação de utilização para confecção de tintas anti-incrustantes, não estando ao menos presente alguma informação quanto a periculosidade à saúde e ao meio ambiente. (CESBRA QUÍMICA, 2018). Isso permite por exemplo, que amadores tenham acesso a esse tipo de produto e o utilizem de forma discriminada, como a exemplo de alguns pescadores e proprietários de estaleiros menores e de marinas particulares.



#### Inscrição

O Cloreto de Tri-butil Estanho (TBTCl) "CESBRA" é um produto químico orgânico de Estanho, produzido por um processo especialmente desenvolvido pela CESBRA e utilizado na indústria de tintas como agente anti-incrustante, na fabricação de defensivos agrícolas e no tratamento de madeiras, tecidos e couro.

**Figura 5. Captura de tela mostrando anúncio de venda de TBTCl no site CESBRA.**  
Disponível em: <https://2122-br.all.biz/o-cloreto-de-tri-butil-estanho-tbtcl-cesbra-q3678>.  
Acessado em: 18/12/2018.

Importantes estudos brasileiros mostram áreas de contaminação por OTs ao longo da costa do país, como na baía de Guanabara no Rio de Janeiro, onde observou-se *imposex* em gastrópodes, evento usado como importante indicador de contaminação por OTs (LIMAVERDE et al., 2007), na baía de Todos os Santos, Bahia, detectou-se grandes quantidades de TBT no sedimento e em mexilhões (BORGES et al., 2013). No Espírito Santo estudos mostraram *imposex* em fêmeas de gastrópodes das espécies *Thais deltoidea*, *Leucozonia nassa*, *Leucozonia ocellata*, além de malformações no aparelho reprodutor masculino em machos das duas últimas espécies, corroborando com os altos níveis de OTs na baía de Vitória (COSTA et al., 2008, 2014, 2017).

Devido ao seu poder biocumulativo, o TBT e os produtos da sua degradação acabam contaminando peixes, lulas, moluscos, e até os predadores de topo de cadeia, como golfinhos, focas, baleias, pássaros que se alimentam de peixes (SONAK et al., 2009) e espécies de plantas e espécies marinhas que fazem parte da dieta humana, como ostras, salmão de viveiro, mexilhões e algas marinhas (OLIVEIRA; SANTELLI, 2010). Apesar da ingestão de frutos do mar

contaminados ser a fonte mais importante de contaminação, existem outras formas de exposição aos OTs, como ingestão de resíduos do solo/sedimentos contaminados, absorção dérmica e inalação (ESFA, 2004). Um estudo no Japão reportou que o consumo diário de TBT no país no ano de 1995 estava entre 2,2 a 6,9 µg, e o valor estimado de consumo por humanos via ingestão de alimentos de origem marinha no mundo estava entre 0.18 a 2.6 µg/dia/pessoa (KOTAKE, 2012). A *European Food Safety Authority* (ESFA), estabeleceu um nível “seguro” de consumo diário de organoestânicos, sendo o TDI (*Tolerable Daily Intake*) equivalente a 250 ng/Kg de peso corporal (RANTAKOKKO et al., 2013).

Contudo, trabalhos científicos realizados pelo nosso grupo demonstram que concentrações menores que esse valor tem poder suficiente para causar danos a diversos à reprodução e metabolismo. Como no trabalho de Podratz et al. (2012) onde observou-se alterações no ciclo estral de ratas Wistar tratadas com 100 ng/Kg/ por 15 dias, bem como perturbação dos níveis hormonais como estrogênio e progesterona, peso ovariano, além de alterar o número de corpos lúteos e de folículos atresícos. Bertuloso et al. (2015) demonstraram maior ganho de peso, adiposidade aumentada, inflamação do tecido adiposo, perturbação do controle metabólico envolvendo a interligação entre fígado, pâncreas e tecido adiposo (100 ng/Kg/15 dias), Coutinho et al. (2016) observaram inflamação, estresse oxidativo e consequente disfunção renal em ratas Wistar (100 ng/Kg/15 dias), Merlo et al. (2016) observaram desregulações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, envolvendo aumento de iNOS hipotalâmica, estresse oxidativo e inflamação e deposição lipídica e de colágeno aumentada (100 ng/Kg/15 e 30 dias), Sena et al. (2017) identificaram anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, por meio da desregulação da sinalização de kisspeptina, redução na expressão de GnRH, alteração nos níveis de LH, e da fertilidade (100 ng/Kg/15 dias) (SENA et al., 2017) de Araújo et al. (2018) reportaram prejuízo na função ovariana, via desregulação de PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$  e Lipina-1 e deposição lipídica neste órgão (DE ARAÚJO et al., 2018b).

Outros grupos também demonstraram os efeitos nocivos dos organoestânicos sobre mamíferos, onde observou-se que o TBT (15 mg/Kg/30 dias) e TPT (6 e

12 mg/Kg/30 dias) modificaram o peso dos órgãos reprodutivos de ratos *Wistar* e produção de testosterona (GROTE et al., 2004). A exposição pré-natal ao TBT (5,43 nM, 54,2 nM e 542 nM) aumentou os pesos do tecido adiposo, bem como o número de adipócitos e seu tamanho, acumulação lipídica hepática, e alteração gênica favorável ao acúmulo de lipídios no fígado, ao longo de três gerações, em estudo transgeracional realizado com camundongos fêmeas C57BL/6J, (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013a), e TBT (0,5, 5 e 50 µg/Kg/ 45 dias) promoveu aumento de peso, níveis de glicose, insulina e adiponectina em jejum, seguido de redução dos níveis de glucagon circulante, inibiu a expressão dos componentes da sinalização do receptor de insulina (IR) na musculatura esquelética e no fígado de camundongos (LI et al., 2017).

Há pouca informação científica sobre o efeito dos OTs na GM, e os trabalhos que a possuem, não têm como foco principal este órgão (Tabela 2), sendo até então descrito *in vivo*, a elevação na deposição lipídica no tecido mamário de fêmeas de camundongos C57BL/6J expostas ao TBT nas concentrações 0,05 e 0,5 mg/Kg de peso corporal (GRÜN et al., 2006), e *in vitro*, TBT e Trifenilestanho (TPT), mostraram toxicidade em diferentes concentrações em culturas de células MCF-7 e MDA-MB-231 (HUNAKOVA et al., 2016) e TBTCI em concentrações menores que os níveis fisiológicos em humanos, apresentou agonismo com receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e aumentou a síntese de aromatase em cultura de células MCF-7 (SHARAN; NIKHIL; ROY, 2013).

Este trabalho, portanto, foi desenvolvido com o intuito de investigar os efeitos da exposição ao desregulador endócrino TBT sobre as glândulas e tecido adiposo mamário de ratas *Wistar*, levantando desta forma, novas questões a respeito da atividade deste contaminante ambiental no organismo de mamíferos.



## 2.0 JUSTIFICATIVA

A exposição aos contaminantes ambientais como os desreguladores endócrinos é uma realidade nos tempos atuais, visto que existem inúmeras fontes que os levam ao meio ambiente e ao contato com os seres vivos nele inseridos. Como exemplo de fontes, temos as atividades marítimas, industriais e a agricultura não sustentável, onde aditivos, estabilizantes, conservantes, agrotóxicos e outros são frequentemente produzidos, utilizados e descartados inadequadamente.

Estudos têm demonstrado os efeitos negativos e nocivos de diversos compostos, como os OTs. Estes dentre outros efeitos, tem a capacidade de induzir a obesogênese e a desregulação endócrina, levando a prejuízos reprodutivos e metabólicos, como infertilidade, síndrome do ovário policístico (PCOS), obesidade, e síndrome metabólica.

Graças ao seu poder de desregulador endócrino, os OTs prejudicam na morfologia e função dos órgãos reprodutivos e dos demais que são dependentes de atividade hormonal, tanto para seu desenvolvimento quanto para desempenhar suas atividades. A GM, como os demais órgãos do trato reprodutivo feminino, é dependente de atividade hormonal desde a sua formação na fase embrionária até na fase adulta, quando após a gravidez tem de desempenhar a função de produzir o leite e consequentemente nutrir e proteger os recém-nascidos dos mamíferos de forma geral.

Por serem hormônio-dependentes as GMs são alvos de complicações envolvendo alterações na produção e ação hormonal. Dentre as complicações estão as doenças que podem ser desde atrofia, eventos fibróticos até eventos neoplásicos, onde se enquadra o câncer, estando o de mama entre as doenças que mais levam a óbito no mundo.

Nesse contexto, após pesquisas realizadas, pouco foi observado na literatura sobre a ação dos organoestênicos como o TBT na glândula mamária, sendo inclusive, a maioria das informações levantadas feitas em estudos *in vitro*. Sabendo-se da potencial ação obesogênica e inflamatória do TBT sobre outros órgãos do trato reprodutivo, a hipótese é que a exposição deste composto em

ratas leve a alterações de caráter inflamatório, obesogênico e atrófico na glândula mamária.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o possível efeito tóxico da exposição ao desregulador endócrino tributilestanho em glândulas mamárias de ratas Wistar.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Validar os efeitos da exposição ao TBT.
- II. Avaliar morfologia e alterações morfométricas.
- III. Analisar o perfil inflamatório mamário.
- IV. Avaliação do estresse oxidativo mamário.
- V. Avaliação do remodelamento tecidual/fibrose mamário.
- VI. Determinação de expressão proteica por *western blot* visando complementar dados indicativos de inflamação, estresse oxidativo, fibrose e obesogênese.

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais.

Foram utilizadas 20 ratas *Wistar* com 3 meses de idade, alocadas em gaiolas adequadas com umidade (entre 40-60 %) (BRASIL, 2013) e luminosidade controladas, sob um ciclo de claro/escuro 12/12h com acesso à dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA – 50/2017). Os animais foram divididos em: (a) sham-gavagem (CON, tratamento via gavagem com solução veículo de etanol 0.4 %); (b) TBT100 (TBT100, tratamento via gavagem com solução de tributilestanho, 100 ng/Kg, Sigma St. Louis, MO, em solução etanólica 0.4 %, durante 15 dias);

### 4.2 Análise do ciclo estral.

Foi realizada a coleta de lavado vaginal durante os 15 dias de tratamento com tributilestanho a fim de acompanhar as fases do ciclo estral (SENA et al., 2017) e confirmar a alteração do mesmo no grupo TBT. As ratas foram eutanasiadas por decapitação sem anestesia (DALPIAZ et al., 2013), pois era de interesse realizar a dosagem de hormônios e citocinas das mesmas, e visto que a literatura apresenta divergência quanto a alterações referentes ao uso de cetamina e xilazina (FOX, 2015; GOULD, 2008; SAHA et al., 2005) optamos por este tipo de eutanásia.

A eutanásia foi realizada na fase de estro, fase esta, que a maioria das ratas se encontrava ao fim do tratamento, padronizando desta forma, uma única fase do ciclo estral, evitando o viés da diferença de níveis hormonais (caso eutanasiados em diferentes fases) entre os animais o que poderia implicar na morfologia e outros parâmetros analisados neste estudo, e evitando também que os animais ficassem muito tempo sem a exposição contínua ao TBT.

### 4.3 Análise histológica, morfometria e histoquímica.

#### 4.3.1 Preparação e análise de *whole mount*.

As glândulas mamárias do 4º par do lado direito foram dissecadas e dispostas de forma esticadas em lâminas de vidro com dimensões de 50 x 76 mm, onde ficaram à temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso foram alocadas em cubas de vidro contendo fixador carnoy's, por um período de 4 horas. Passado

esse tempo as glândulas foram lavadas em álcool 70 % por 15 minutos e hidratadas ao longo de banhos seriados de solução alcoólica em concentração decrescente, finalizando com água destilada (5 minutos cada banho). As lâminas contendo as glândulas foram então imersas em outra cuba de vidro contendo o corante carmine, onde ficaram em processo de coloração overnight. Após a completa coloração (quando se observou as ramificações de ductos e os linfonodos corados), o tecido mamário foi desidratado em banhos de concentrações crescentes de soluções alcoólicas. As mamas foram dispostas em outra cuba contendo xilol onde foram diafanizadas até total remoção da gordura tecidual. Após esse processo, as lâminas foram armazenadas em cubas contendo salicilato de metila (DE ASSIS et al., 2010; PLANTE; STEWART; LAIRD, 2011).

As glândulas mamárias coradas foram analisadas em microscópio óptico, em objetiva de 4 vezes. Delineou-se 3 regiões distintas em cada glândula, sendo elas, área próxima da papila mamária, área central e área distal (próxima da camada gordurosa). Dentro de cada uma destas regiões, cinco campos foram analisados onde o número de TEBs, terminais alveolares 1 (AB1) e 2 (AB2) e lóbulos (L) foram contados. Foi aplicado às contagens de AB1, AB2 e L um escore de 0-5, o qual foi utilizado para obtenção do grau de diferenciação DF1 ( $AB1 + AB2 + L$ ) e DF2 ( $L / AB1 + AB2$ ), quanto maior a razão  $L / ABs$ , mais diferenciada se encontra a glândula mamária (MONSEFI et al., 2015).

#### **4.3.2 Histomorfometria da GM e do tecido adiposo mamário.**

As glândulas mamárias do 4º par do lado esquerdo foram dissecadas e imersas em fixador e embebidos em paraplast a 60 °C (Sigma). Após isso, foram feitas secções de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análises histopatológicas. Sendo que os protocolos de coloração estavam de acordo com (BERTULOSO et al., 2015). A avaliação e imagens foram obtidas na câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

Um total de 20 micrografias foram obtidas por animal sob a objetiva de 40x e realizou-se a contagem de adipócitos pela área das imagens. Mediu-se o diâmetro dos adipócitos utilizando o software FIJI (*ImageJ*), sendo utilizado

como valor representativo, a média dos diâmetros dos adipócitos de menor e de maior tamanho observados nas fotos (total de 60 células por animal), os valores foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

#### **4.3.3 Contagem de mastócitos.**

Cortes histológicos foram corados pelo método de *Alcian Blue*. Em microscópio óptico, foram contados mastócitos por campo, sendo contados separadamente mastócitos em contato com os ductos mamários e os presentes no tecido adiposo mamário. Ao todo de cada corte foram contados 20 campos para ductos e 20 campos para tecido adiposo. As contagens realizadas e imagens obtidas por meio da câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

#### **4.3.4 Depósito de colágeno.**

Dois cortes de cada animal foram obtidos e depositados em lâminas de vidro, sendo posteriormente corados com *Picrosirius Red* para identificação e morfometria de fibras colágenas (área  $\mu\text{m}/\text{campo}$ ). As análises foram realizadas em programa FIJI versão 3.7.3 (*ImageJ* 2018). Ao todo, 20 campos de cada lâmina foram fotografados e utilizados para quantificação. As imagens foram obtidas na câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

#### **4.4 Avaliação de triglicerídeo do tecido mamário.**

Amostras de tecido mamário foram homogeneizadas em salina, na proporção de 1:4 (g/mL) e o conteúdo de triglicerídeos foi determinado por colorimetria (Bioclin, GM, Brasil) (LIMA et al., 2012).

#### **4.5 Processamento das amostras para dosagem de MPO e NAG.**

Em torno de 100 mg de tecido mamário foi pesado e processado com homogeneizador de tecidos em buffer 1 (NaCl 0,1 M,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,02M e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,015 M), centrifugados a 9000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e fez-se a ressuspensão do pellet com soluções geladas de NaCl 0,2 % e NaCl 1,6 % + 5 % de glicose. Homogeneizou-se as amostras e foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 9000 G. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em buffer 2, contendo  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  e Brometo de Hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio 0,5 % p/v) (HETAB,

importante detergente iônico que ajuda na solubilização e extração da MPO). As amostras foram homogeneizadas e divididas em duas partes iguais, sendo uma destinada à realização do ensaio de NAG e a outra para o ensaio do MPO.

#### **4.6 Avaliação da atividade de MPO (Mieloperoxidase) – Presença de neutrófilos.**

Após a divisão do homogenato, a amostra destinada à dosagem do MPO foi congelada e descongelada em freezer -80 por três vezes e centrifugadas por 15 minutos a 9000 G a 4°C. Após o processamento da amostra, em uma placa de microtitulação de 96 poços pipetou-se em duplicata 25 µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido), (Sigma-Aldrich, StLouis, USA), seguido de incubação por 5 minutos a 37°C. Por seguinte adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,002 % e incubou-se novamente a 37 °C por 5 minutos. Após a incubação, paralisou-se a reação com 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após a interrupção da reação, foi feita a leitura da absorbância em 450 nm. A média dos valores da duplicata foi usada para determinação da atividade da enzima de interesse.

#### **4.7 Avaliação da atividade de NAG (N-acetil-β-D-glicosaminidase) – Presença de macrófagos.**

A avaliação da infiltração tecidual por macrófagos foi realizada com a outra parte do homogenato processado anteriormente. Inicialmente acresceu-se salina 0,9 % contendo Triton X-100 0,1 % vol/vol (Promega) e depois centrifugou-se por 10 minutos a 1400 G à temperatura de 4°C. Após processamento da amostra, 100 µL das amostras foram plaqueadas em duplicata para placa de microtitulação de 96 poços, foi adicionado 100 µL do substrato P-nitrofenil-Nacetil-β-D-glicosaminida (Sigma). Após uma incubação de 10 minutos, adicionou-se 100 µL de tampão glicina, a fim de para a reação. Para detecção da atividade de NAG, a leitura da absorbância foi realizada em 400 nm. A média dos valores da duplicata foi usada para determinação da atividade da enzima de interesse.

#### **4.8 Análise de espécies reativas de oxigênio**

Após a eutanásia, os órgãos foram imersos em OCT (Tissue-Tek®, Compound, Sakura) para confecção do bloco histológico e congelado em freezer -80°C. Posteriormente, foram realizados cortes de 8 µm em micrótomo criostato e colocadas sobre lâminas de vidro identificadas. Os cortes foram incubados com solução Krebs contendo dihidroetídio 2 µM durante 30min a 37°C. Ao final, as lâminas (5 fotos em cada lâmina) foram fotografadas para posterior medida de intensidade da fluorescência emitida nos cortes, o que indica a produção de ânion superóxido (MERLO et al., 2016).

#### **4.9 Determinação de peroxidação lipídica mamária – TBARS (Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)**

Foram pesados 150 mg de tecido mamário foram pesados e processados em gelo com homogeneizador de tecidos em 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS 1x) em microtubos devidamente identificados. O volume de 100 µL dos homogenato foram transferidos e homogeneizados em vortex em criotubos, juntamente com 100 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 1 %) e 50 µL de ácido fosfórico (7 %). Os criotubos então foram alocados em estante de arame e levadas à estufa a 100°C por 15 minutos. Passado esse tempo os tubos foram colocados em caixa térmica e cobertos com gelo, onde permaneceram por 10 minutos. Após isso, adicionou-se 500 µL de butanol aos tubos e os mesmos foram levados à centrifugação por 5 minutos a 360 G. Pipetou-se 250 µL da fase sobrenadante para microplaca de 96 poços, em duplicata, igualmente ao branco (HCl 1N, TBA 1 % e ácido fosfórico 7 %; proporção 1:1:1). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda 532 e 600 nm. A absorbância de 600 nm foi subtraída da de 532 para diminuir absorbância inespecífica. O coeficiente de extinção  $155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  foi utilizado para determinação da produção de malondialdeído (HODGES et al., 1999).

#### **4.10 Determinação da concentração de glutatona reduzida – GSH.**

Pesou-se 150 mg de tecido mamário em microtubo, e em gelo homogeneizou-se junto de 100 µL de PBS 1x e 300 µL de ácido tricloroacético (TCA 12,5 %) com homogeneizador de tecidos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 800 G a 4°C. Pipetou-se então em duplicata 40 µL do sobrenadante para microplaca de 96 poços, juntamente com 200 µL de TRIS-HCL 0,4 M e 20

$\mu\text{L}$  de DTNB (3,95 mg/mL). Pipetou-se também uma curva padrão de GSH nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,01 mg/mL. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 415 nm, e o cálculo de concentração foi realizado em utilizando-se a curva padrão de GSH (BECKER; SOLIMAN, 2009; TIETZE, 1969).

#### **4.11 Análise de expressão proteica da GM por Western blot**

As amostras de GM foram processadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo os inibidores de protease com um homogeneizador e posteriormente, centrifugadas a 10000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais (LOWRY et al., 1951). Após as dosagens, o volume necessário foi retirado de cada amostra para uma concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas totais, em um volume final de 15  $\mu\text{L}$ , após adição de água e do tampão de amostra, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol. As proteínas foram desnaturadas a 100 °C, por 5 minutos. O SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis com dodecilsulfato de sódio) foi preparado usando 10-15 % de SDS e poliácridamida (acrilamida e bisacrilamida) (para proteínas de alto peso molecular, foram utilizados géis de 10 %; para as demais, géis de 15 %). A corrida de eletroforese teve duração de 1 hora e 30 minutos a uma corrente constante de 0,07A. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA). Após a transferência por 2 horas a uma corrente constante de 0,25A, as membranas foram lavadas com tampão tris-salina 0.05 % e tween 20 (TBS-T), e bloqueadas com leite em pó desnatado 5 % em solução de TBS-T por 1 hora. As membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 10 minutos e incubadas com seus respectivos anticorpos primários, conforme a Tabela 1 (diluídos em leite em pó desnatado 3 % em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C). As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (IgG conjugado a fosfatase alcalina, diluído em leite em pó desnatado 3 % em TBS-T, por 1 hora). O resultado do western blotting foi visualizado por reação colorimétrica utilizando-se os reveladores NBT (nitroblue tetrazolium chloride) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt) (sc24981; SCBT, Inc).




As bandas foram analisadas por densitometria, utilizando o Programa FIJI. A expressão relativa foi normalizada pela divisão dos valores da proteína de interesse pelo valor do controle interno.

**Tabela 1: Anticorpos usados na avaliação da expressão proteica**

Anticorpos primários	Código	Diluição
GAPDH	sc-25778, SCBT	1:1250
PPAR $\gamma$	sc-7273, SCBT	1:500
ED1	MCA341GA, BioRad	1:500
ER $\alpha$	sc-7207, SCBT	1:500
CYP19	sc-374176, SCBT	1:500
GP91-PHOX	sc-130543, SCBT	1:500
COL1A1	sc-293182, SCBT	1:500
COL3A1	sc-271249, SCBT	1:500
Anticorpos secundários	Código	Diluição
IgG anti-coelho + fosfatase alcalina	A3687, Sigma-Aldrich	1:1000
IgG anti-camundongo + fosfatase alcalina	A3562, Sigma-Aldrich	1:1000

**Tabela 1:** GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PPAR $\gamma$ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; ED1: antígeno ED1 de macrófagos; ER $\alpha$ : receptpr de estrogênio alfa; CYP19: aromatase; GP91-PHOX: glicoproteína 91-phox (subunidade da NADPH oxidase); COL1A1: colágeno  $\alpha$ 1 tipo I; COL3A1: colágeno  $\alpha$ 1 tipo III. IgG: imunoglobulina G; SCBT: Santa Cruz Biotechnology, INC.

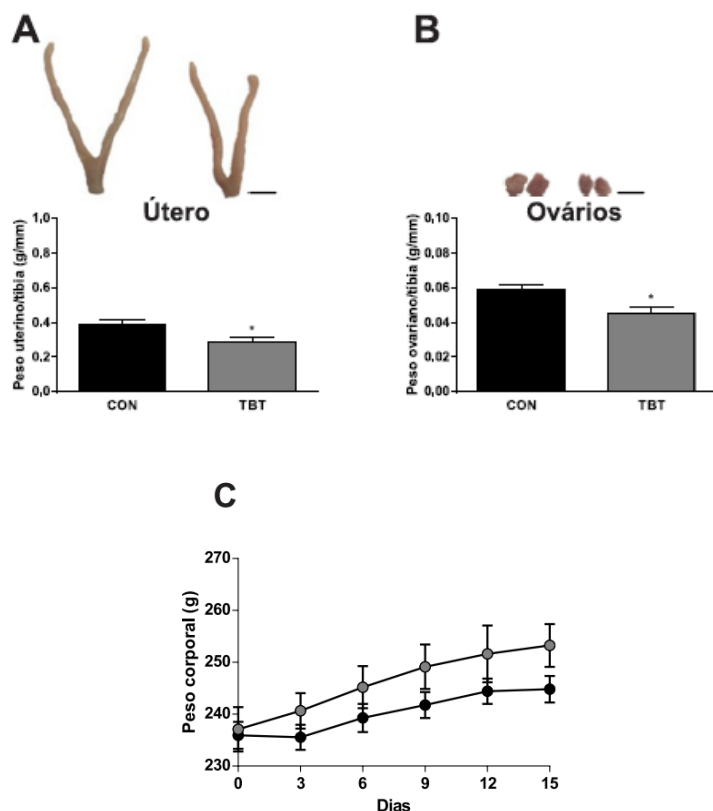
#### 4.12 Análise Estatística

Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste de normalidade usado foi o  *Pearson omnibus*. As comparações entre dois grupos foram realizadas com teste t para dados Gaussianos. Para dados não Gaussianos, foi usado o teste de Mann-Whitney. Para o acompanhamento de peso ao longo do tratamento utilizou-se ANOVA de duas vias seguido de pós teste de *Bonferroni*. Para avaliar a relação entre os parâmetros avaliados, foi utilizada a correlação de *Spearman* ou *Pearson* para distribuição não Gaussiana ou Gaussiana, respectivamente. Todas as correlações foram obtidas a partir de valores de animais emparelhados. Finalmente, quando a significância estatística foi identificada, testamos se a regressão linear ou não linear foi melhor ajustada. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ , programa estatístico Prisma 6.0 (La Jolla, CA, USA).

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 A exposição ao TBT alterou os pesos de ovário e útero, mas não o peso corporal.

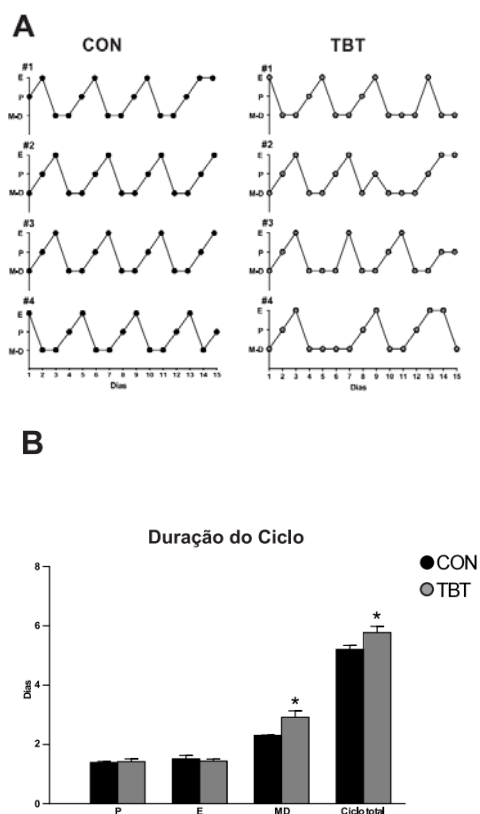
Redução dos pesos uterino (CON:  $0,38 \pm 0,02$ ; TBT:  $0,29 \pm 0,02$  g/tíbia; Figura 6A) e ovarianos (CON:  $0,06 \pm 0,003$ ; TBT:  $0,04 \pm 0,003$  g/tíbia; Figura 6B) foram encontrados nas ratas expostas ao TBT. Enquanto que, no peso corporal, não foi observado diferença ao longo dos 15 dias de exposição ao TBT, sendo notada uma tendência no dia 15 (CON:  $244 \pm 2,55$ ; TBT:  $253 \pm 4,11$ ; Figura 6C).



**Figura 6: Análise do peso dos órgãos reprodutivos e corporal.** (A) Peso uterino. (B) peso ovariano. (C) Peso corporal das ratas CON e TBT ao longo dos 15 dias de tratamento. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=6-8$  \* $p<0.05$ .

### 5.2 Ratas expostas ao TBT apresentaram alterações no ciclo estral.

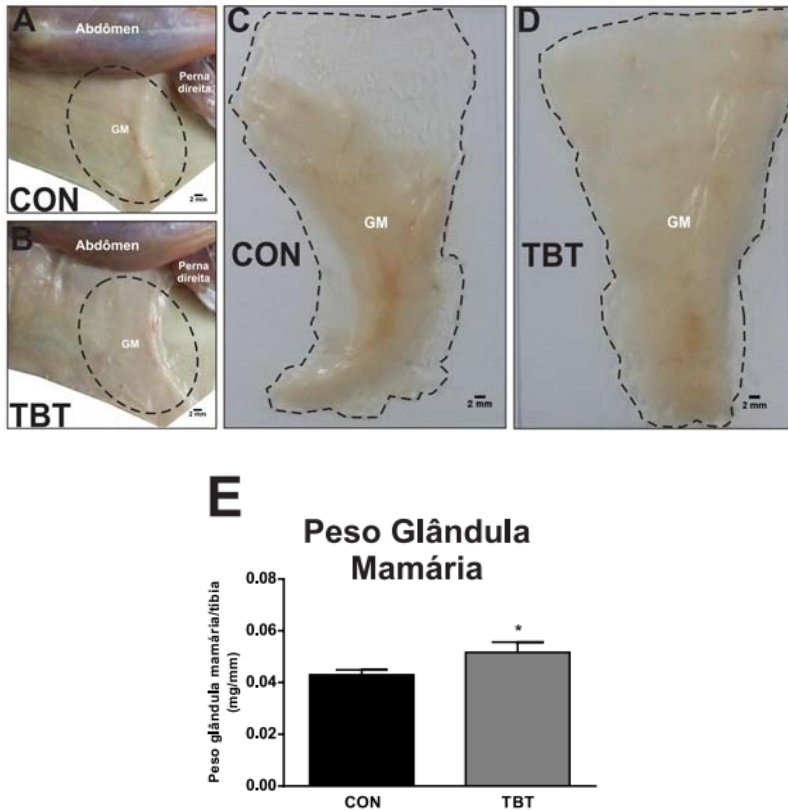
Ratas expostas ao TBT ao longo de 15 dias apresentaram anormalidade no padrão do ciclo estral, quando comparado ao grupo controle (Figura 7A). Prolongamento na fase de MD (CON:  $2,31 \pm 0,01$ ; TBT:  $2,91 \pm 0,22$  dias; Figura 7B) foi observado nos animais expostos ao TBT, e em resposta a esse evento, houve também aumento da duração total do ciclo estral (CON:  $5,21 \pm 0,13$ ; TBT:  $5,77 \pm 0,21$  dias; Figura 7B) nas ratas tratadas com TBT. Diferenças não foram notadas nas fases P e E (Figura 7B).



**Figura 7: Avaliação do ciclo estral.** (A) Ciclo individual ao longo dos 15 dias de exposição ao veículo e ao TBT. (B) Duração das fases do ciclo estral e sua duração total. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=6-8$  \* $p<0.05$ .

### 5.3 As GMs das ratas expostas ao TBT apresentaram maior massa adiposa e aumento de peso.

Foi possível notar maior quantidade de massa gorda nas mamas das ratas TBT (Figura 8A, B, C e D). A pesagem das mamas apontou maior peso destes órgãos nos animais TBT (CON:  $0,043 \pm 0,002$ ; TBT:  $0,52 \pm 0,004$  g/tíbia; Figura 8E).



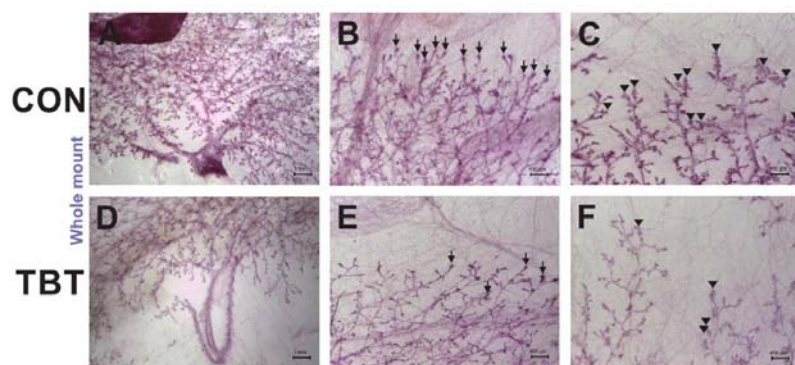
**Figura 8: Dissecção abdominal representativa e peso da GM.** (A e B) Dissecção abdominal da GM do quarto par das ratas CON e TBT respectivamente. (C,D) GM do quarto par das ratas CON e TBT respectivamente montadas em lâminas de vidro. (E) Peso da GM corrigido pelo comprimento da tíbia das ratas CON e TBT. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=7$  \* $p<0.05$ .

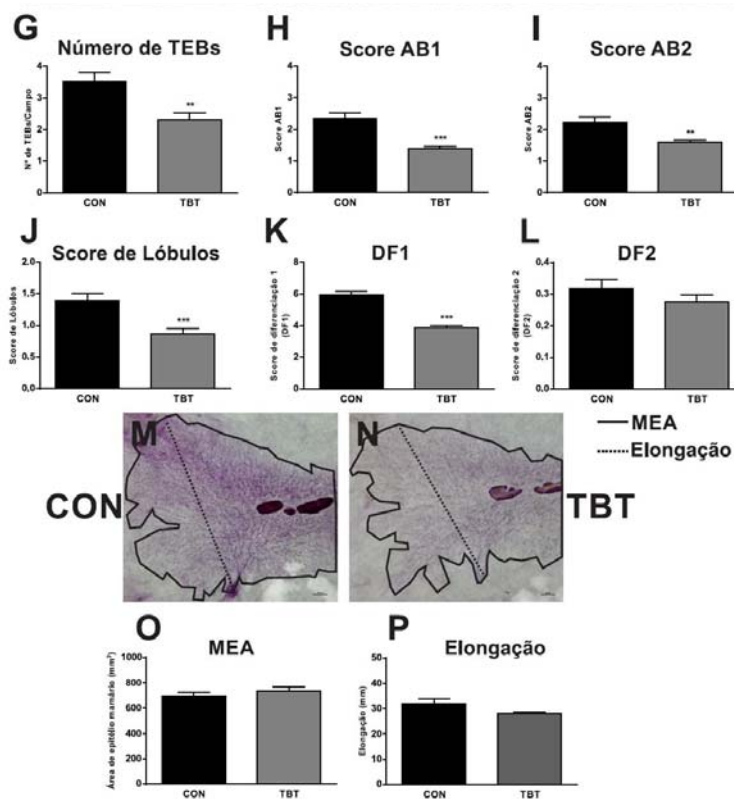
#### 5.4 As GMs das ratas expostas ao TBT apresentaram anormalidades morfológicas.

A técnica de *whole mount* realizada com o corante carmine permitiu analisar e quantificar as estruturas das GMs das ratas (Figura 9 A, B, C, D e F), sendo observado por meio desta, a diminuição quantitativa dos TEBs (CON:  $3,53 \pm 0,27$ ; TBT:  $2,32 \pm 0,21$  Figura 9G), alvéolos tipo 1 (AB1- CON:  $2,35 \pm 0,16$ ; TBT:  $1,40 \pm 0,07$ ; Figura 9H) e tipo 2 (AB2 - CON:  $2,21 \pm 0,16$ ; TBT  $1,60 \pm 0,06$ ; Figura 9I) e lóbulos (CON:  $1,40 \pm 0,10$ ; TBT:  $0,86 \pm 0,08$ ; Figura 9J) nas ratas do grupo TBT.

Utilizando-se dos valores dos escores de AB1, AB2 e lóbulos realizou-se os cálculos dos escores de diferenciação 1 ( $DF1 = AB1 + AB2 + \text{lóbulos}$ ) e de diferenciação 2 ( $DF2 = (AB1 + AB2)/\text{lóbulos}$ ), pelos quais foi encontrado redução no escore DF1 (CON:  $5,96 \pm 0,21$ ; TBT:  $3,86 \pm 0,14$ ; Figura 9K) nas ratas expostas ao TBT, mas não no escore DF2.

Com auxílio do software FIJI (*ImageJ*), fotografias das GMs foram utilizadas para medição da sua área de epitélio mamário (MEA= área medida em torno da GM) e da sua elongação (Distância medida a partir da área da papila mamária até o ponto mais distal da GM) (Figura 9M e N). Contudo, não foram observadas diferenças em ambos os parâmetros (Figura 9O e P)





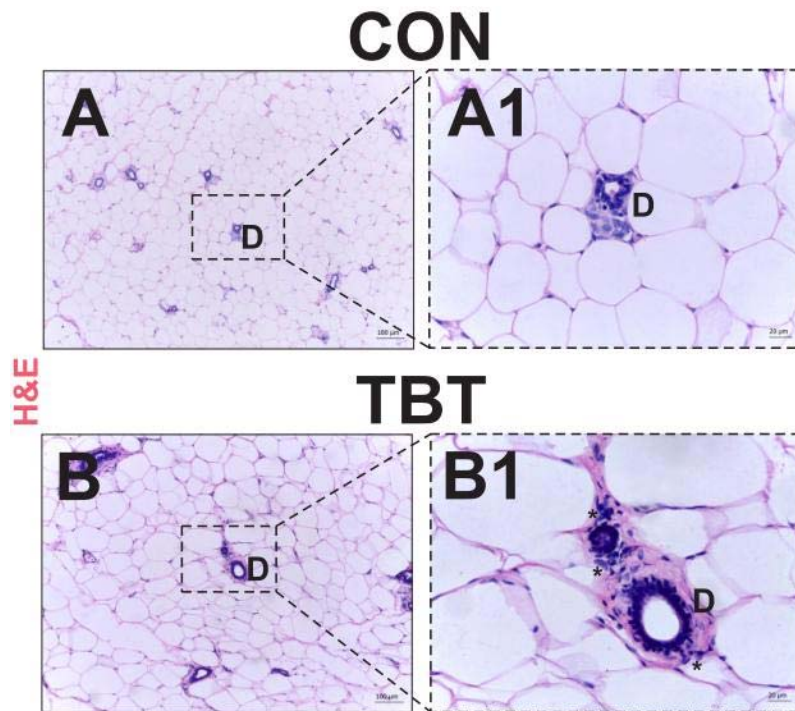
**Figura 9: Análise morfométrica das GMs pela técnica whole mount.** GMs coradas com carmine mostrando diferenças na densidade de ductos e das estruturas de elongação (TEBs - indicados pelas setas) e das estruturas que desempenham a produção do leite (lóbulos - indicados pelas cabeças de seta) das ratas CON (A, B e C) e TBT (D, E e F). Quantificação das estruturas mamárias TEBs (G), escores AB1 (H), escores AB2 (I) e escore de lóbulos (J). Determinação dos escores diferenciação DF1 (K) e DF2 (L). Fotografias das GMs das ratas CON (M) e TBT (N) coradas com carmine para determinação das medidas de MEA (O) e elongação (P). Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=7$  \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$ .

### 5.5 Ratas expostas ao TBT apresentaram hipertrofia do tecido adiposo mamário e elevação do triglicerídeo tecidual e da expressão de PPAR $\gamma$ .

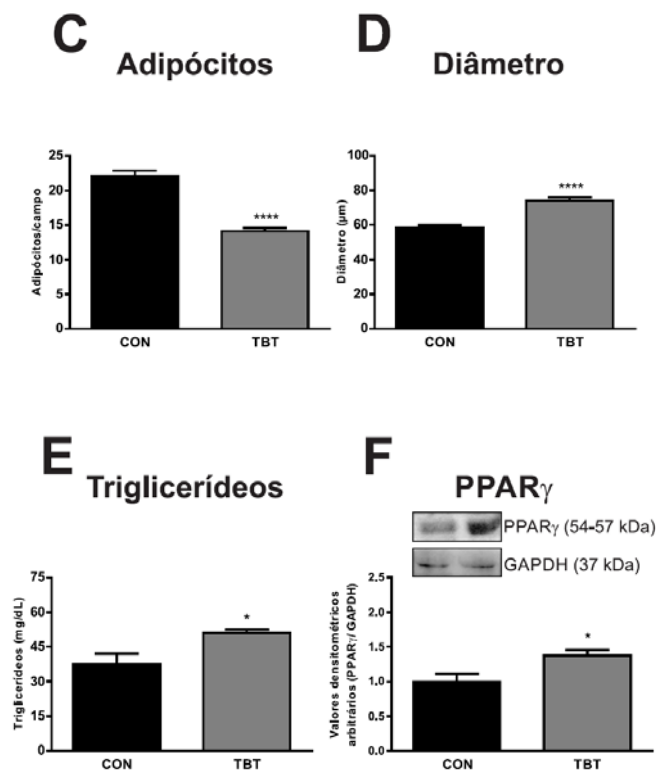
A análise histológica pela coloração de H&E com auxílio do microscópio *Leica* acoplado a câmera ICC50 HD, permitiu a obtenção de fotos do tecido adiposo mamário das ratas CON (Figura 10A e A1) e TBT (Figura 10B e B1) para a

quantificação de adipócitos e a avaliação do seu diâmetro com o software FIJI. Observou-se por meio desta análise redução quantitativa na contagem de adipócitos por campo (CON:  $22,15 \pm 0,69$ ; TBT:  $14,10 \pm 0,48$  adipócitos/campo; Figura 10C), sendo isto reflexo do aumento do diâmetro adipocitário (CON:  $58,23 \pm 1,74$ ; TBT:  $74,19 \pm 1,68$   $\mu\text{m}$ ; Figura 10D) sugerindo um processo hipertrófico nessas células.

Por meio de método colorimétrico, foi encontrado aumento de triglicerídeos nas GM das ratas TBT (CON:  $37,44 \pm 4,70$ ; TBT:  $51,06 \pm 1,38$  mg/dL; Figura 10E). Além disso, também foi realizada análise da expressão proteica de PPAR $\gamma$ , a qual também se encontrou aumentada no grupo TBT (CON:  $1,00 \pm 0,11$ ; TBT:  $1,37 \pm 0,08$  u.a; Figura 10F).



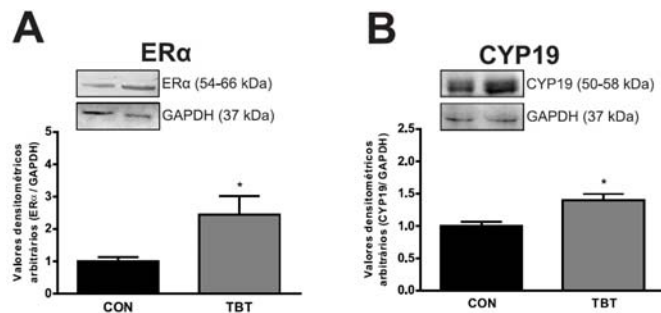




**Figura 10: Análise histomorfológica das GMs.** Secções histológicas coradas em H&E das GMs das ratas CON (A e A1) demonstrando tecido mamário regular com ducto (representado por D) envolto por tecido conjuntivo e tecido adiposo mamário e das ratas TBT (B e B1) com ducto apresentando elevada quantidade de tecido conjuntivo, células inflamatórias (asteriscos) e adipócitos hipertróficos. (C) Quantificação de adipócitos por campo e (D) Diâmetro dos adipócitos. (E) Triglicerídeo da GM e (F) expressão proteica de PPAR $\gamma$ . Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=7$  \* $p<0.05$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

### 5.6 TBT aumentou a expressão de ER $\alpha$ e CYP19 na GM.

A expressão proteica de ER $\alpha$  e CYP19 foi avaliada por meio de *western blotting*. As ratas do grupo TBT apresentaram aumento da expressão de ER $\alpha$  (CON:  $1,00 \pm 0,13$ ; TBT:  $2,44 \pm 0,56$  u.a; Figura 11A) e CYP19 (CON:  $1,00 \pm 0,06$ ; TBT:  $1,40 \pm 0,09$  u.a; Figura 11B).



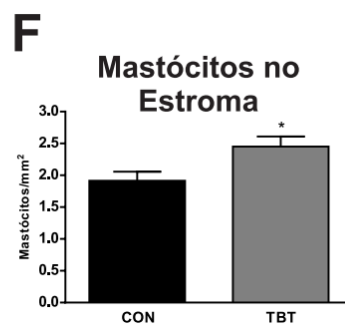
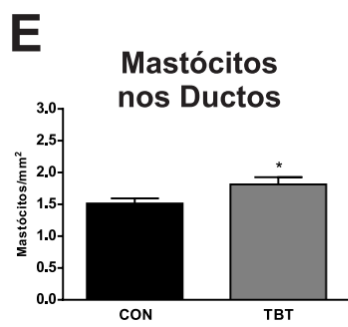
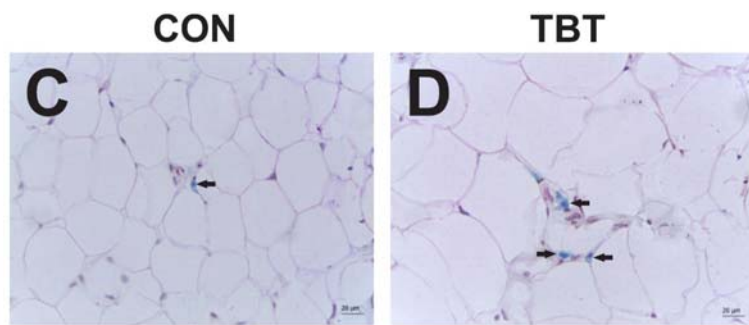
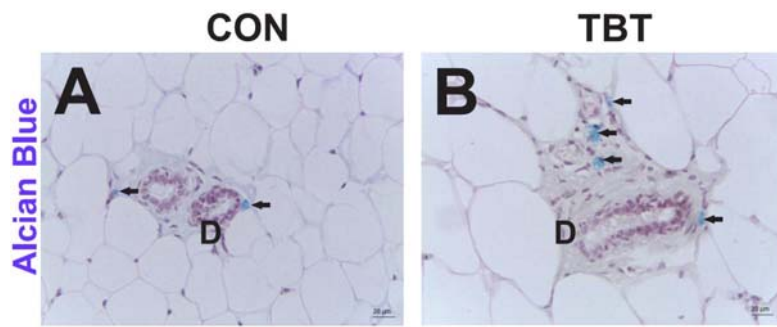
**Figura 11: Análise da expressão proteica de ERα e CYP19 na GM.** (A) Expressão proteica de ERα (A) e CYP19 (B) determinada por western blotting. Valores expressos como média ± EPM. n=7 \*p<0.05.

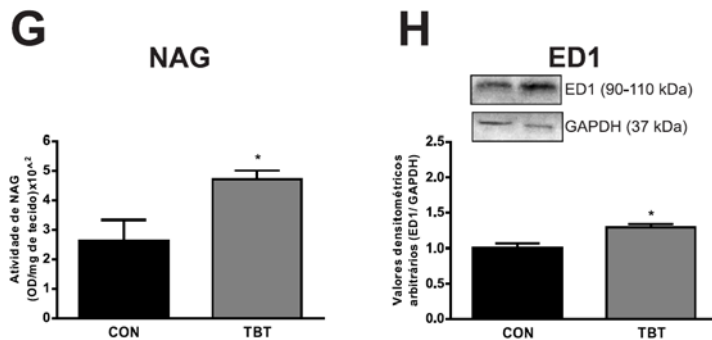
### 5.7 Ratas expostas ao TBT apresentaram perfil inflamatório elevado.

A inflamação na GM foi avaliada por contagem de mastócitos, onde secções foram coradas com *Alcian blue* e as lâminas fotografadas na objetiva de 40x. Foi realizada a contagem de mastócitos em contato com os ductos das ratas CON (Figura 12A) e TBT (Figura 12B) e de mastócitos no estroma mamário dos grupos (tecido adiposo adjacente), CON (Figura 12C) e TBT (Figura 12D).

A contagem permitiu observar o aumento na quantidade de mastócitos presentes em contato com os ductos (CON:  $1,51 \pm 0,08$ ; TBT:  $1,81 \pm 0,11$  u.a; Figura 12E) e no estroma mamário (CON:  $1,91 \pm 0,14$ ; TBT:  $2,45 \pm 0,15$  u.a; Figura 12F) nas ratas do grupo TBT.

Além disso, foi determinada a quantificação indireta de macrófagos via dosagem de NAG, onde foi observado aumento na atividade desta enzima nos animais TBT em comparação com os controles (CON:  $2,62 \pm 0,70$ ; TBT:  $4,70 \pm 0,29$  u.a; Figura 12G). Em complementação, a expressão proteica do marcador macrofágico ED1 foi realizada e apontou aumento do mesmo nas ratas TBT em comparação com as CON (CON:  $1,00 \pm 0,06$ ; TBT:  $1,29 \pm 0,04$  u.a; Figura 12H).

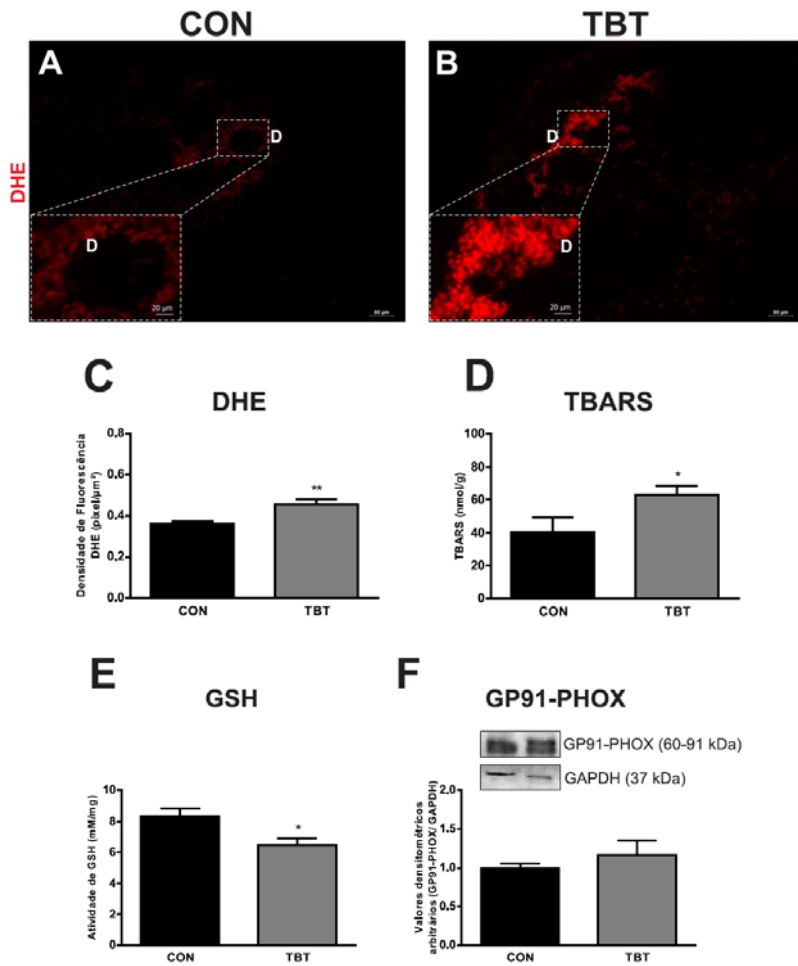




**Figura 12: Análise do perfil inflamatório das GMs.** Secções histológicas das GMs coradas em Alcian blue. Mastócitos corados em contato com os ductos (indicados por setas) nas ratas CON (A) e TBT (B). Mastócitos corados (setas) no estroma mamário das ratas CON (C) e TBT (D). Quantificação de mastócitos em contato com os ductos (E). Quantificação de mastócitos por área de estroma (F). Atividade de NAG (G). Expressão proteica de ED1(H). Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=4-5$  \* $p<0.05$ .

### 5.8 As GMs das ratas expostas ao TBT obtiveram aumento no estresse oxidativo.

Criosecções de tecido mamário previamente emblocado em OCT foram incubadas com dihidroetideo (DHE) para determinação da produção de ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) (Figura 13A e B). A análise proveniente desta técnica permitiu observar aumento na produção de ânions superóxidos nas GMs das ratas TBT em comparação com as controle (CON:  $0,35 \pm 0,01$ ; TBT:  $0,45 \pm 0,02$  u.a; Figura 13C). A peroxidação lipídica das GMs foi determinada via análise de TBARS, cujos resultados apontaram para um aumento deste evento nas ratas TBT (CON:  $40,26 \pm 9,07$ ; TBT:  $63,42 \pm 5,25$  u.a; Figura 13D). A atividade da enzima intracelular antioxidante GSH foi avaliada por colorimetria, e por meio desta encontrou-se redução na atividade desta enzima nos animais do grupo TBT quando comparado ao controle (CON:  $8,36 \pm 0,46$ ; TBT:  $6,46 \pm 0,45$  u.a; Figura 13E). Em complementação ao resultado encontrado na análise do DHE a expressão proteica da subunidade da NADPH oxidase (GP91-PHOX - geradora de ânions superóxidos) foi avaliada. Entretanto, não foi observado aumento na expressão desta proteína (CON:  $1,00 \pm 0,02$ ; TBT:  $1,16 \pm 0,11$  u.a; Figura 13F).



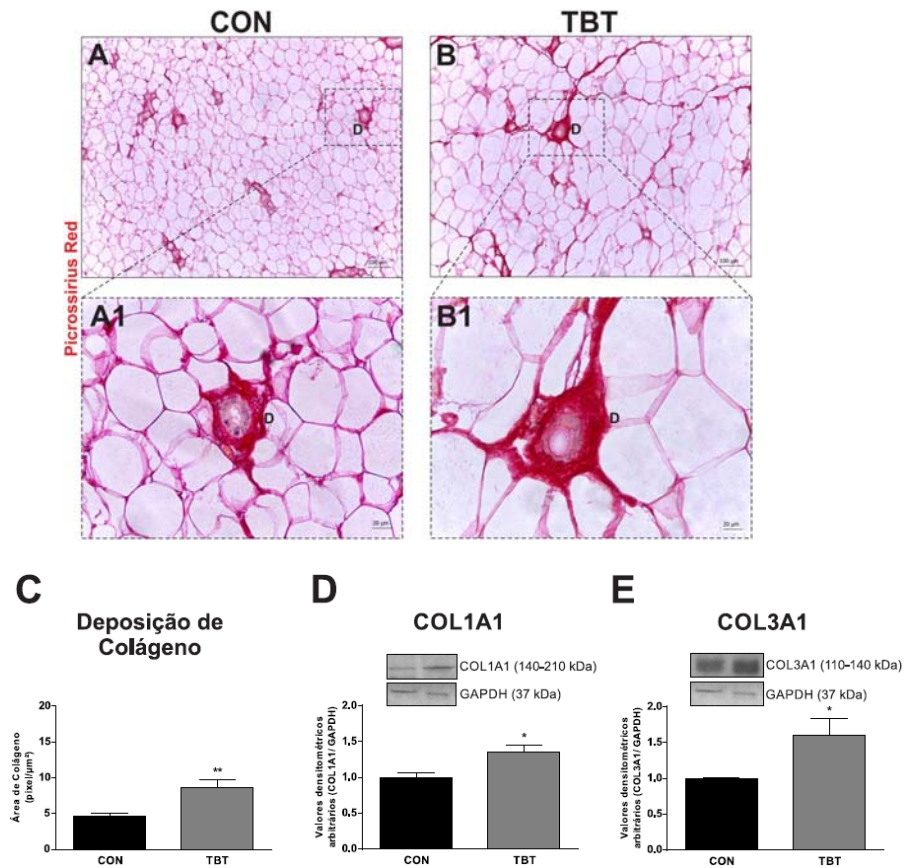
**Figura 13: Análise do estresse oxidativo das GMs.** Criosecções das GMs incubadas com DHE (A e B). Quantificação de fluorescência de DHE (C). Quantificação de TBARS (D). Determinação da atividade de GSH (E). Expressão proteica de GP91-PHOX (F). Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=4-5$  \* $p<0.05$ .

### 5.9 Exposição ao TBT induziu aumento na deposição de colágeno e na expressão de COL1A1 e COL3A1.

Secções histológicas coradas com *Picrosíríus red* foram utilizadas para mensuração da deposição colágena em torno dos ductos mamários das ratas

CON (Figura 14A, A1) e TBT (Figura 14B e B1). Com auxílio do software FIJI, as microfotografias obtidas dos cortes foram avaliadas e sua análise indicou aumento na deposição lipídica nas ratas expostas ao TBT (CON:  $4,58 \pm 0,52$ ; TBT:  $8,69 \pm 1,06$  u.a; Figura 14C).

A expressão de proteínas colágenas foi avaliada de modo a fazer uma caracterização do tipo de colágeno depositado em torno dos ductos, e esta análise permitiu observar aumento na expressão dos tipos COL1A1 (CON:  $1,00 \pm 0,03$ ; TBT:  $1,35 \pm 0,10$  u.a; Figura 14D) e COL3A1 (CON:  $1,00 \pm 0,01$ ; TBT:  $1,62 \pm 0,22$  u.a; Figura 14E) nas ratas do grupo TBT.



**Figura 14: Análise do estresse oxidativo das GMs.** Secções histológicas das GMs coradas com picrossírius red das ratas CON (A e A1) e das ratas TBT (B e B1). Quantificação da deposição de colágeno nos ductos (C). Avaliação da expressão proteica de COL1A1 (D) e COL3A1 (E). Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n=4$  \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

#### 5.10 Análise de correlação entre os parâmetros morfométricos, adipogênicos, inflamação, estresse oxidativo e fibrose.

Para avaliar a relação entre parâmetros morfométricos, adipogênicos, inflamação, estresse oxidativo e fibrose, análises de correlação foram realizadas, um ajuste linear ou não linear foi traçado sempre que apropriado (Figuras 15 e 16).

Foi observada uma correlação linear negativa entre o diâmetro dos adipócitos e o escore AB2 (Pearson  $r$ : -0,69;  $p$ = 0,05; Fig. 15C) e positiva com expressão proteica de ER $\alpha$  (Pearson  $r$ : 0,84;  $p$ = 0,007; Fig. 15G). Contudo, não foi encontrada correlação linear entre o diâmetro de adipócitos e o número de TEBs (Pearson  $r$ : -0,50;  $p$ = 0,20; Fig. 15A), escore AB1 (Pearson  $r$ : -0,51;  $p$ = 0,18; Fig. 15B), escore de lóbulos (Pearson  $r$ : -0,53;  $p$ = 0,16; Fig. 15D) e escore DF1 (Pearson  $r$ : -0,65;  $p$ = 0,07; Fig. 15E), expressão proteica de CYP19 (Pearson  $r$ : 0,48;  $p$ = 0,22; Fig. 15F).

Os níveis de triglicerídeos apresentaram forte correlação com os parâmetros morfométricos da GM. Por exemplo, os níveis de triglicerídeos da GM se correlacionaram negativamente com número de TEBs (Pearson  $r$ : -0,87;  $p$ = 0,004; Fig. 15H), escore AB1 (Pearson  $r$ : -0,81;  $p$ = 0,01; Fig. 15I), escore de lóbulos (Pearson  $r$ : -0,76;  $p$ = 0,02; Fig. 15K) e escore DF1 (Pearson  $r$ : -0,80;  $p$ = 0,01; Fig. 15L). Não foi observada correlação entre os níveis de triglicerídeos e escore AB2 (Pearson  $r$ : -0,53;  $p$ = 0,17; Fig. 15J), expressão proteica de CYP11A1 (Pearson  $r$ : 0,49;  $p$ = 0,21; Fig. 15M) e de ER $\alpha$  (Pearson  $r$ : 0,51;  $p$ = 0,19; Fig. 15N).

A expressão proteica de PPAR $\gamma$  se correlacionou negativamente com escore AB1 (Pearson  $r$ : -0,85;  $p$ = 0,007; Fig. 15P). Não foi observada correlação entre a expressão proteica de PPAR $\gamma$  com número de TEBs (Pearson  $r$ : -0,39;  $p$ = 0,33; Fig. 15O), escore AB2 (Pearson  $r$ : -0,20;  $p$ = 0,62; Fig. 15Q), escore de lóbulos (Pearson  $r$ : -0,27;  $p$ = 0,50; Fig. 15R), escore DF1 (Pearson  $r$ : -0,54;  $p$ =

0,16; Fig. 15S), expressão proteica de CYP19 (Pearson  $r$ : 0,56;  $p$ = 0,14; Fig. 15T) e de ER $\alpha$  (Pearson  $r$ : 0,36;  $p$ = 0,37; Fig. 15U).

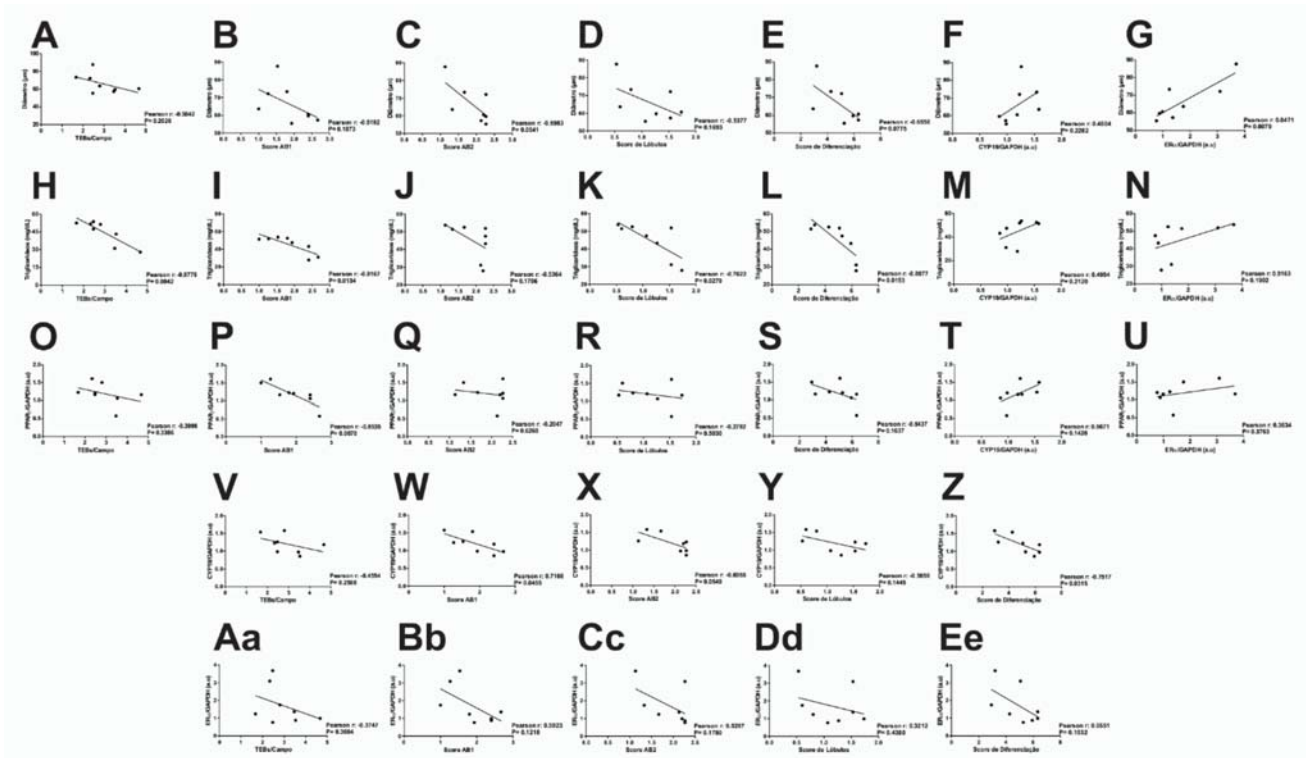
A expressão proteica da CYP19 apresentou correlação negativa com escore AB1 (Pearson  $r$ : -0,71;  $p$ = 0,04; Fig. 15W), escore AB2 (Pearson  $r$ : -0,69;  $p$ = 0,05; Fig. 15X) escore DF1 (Pearson  $r$ : -0,75;  $p$ = 0,03; Fig. 15Z). Não encontramos correlação significativa entre expressão de CYP19 e número de TEBs (Pearson  $r$ : -0,45;  $p$ = 0,25; Fig. 15V) e L escore (Pearson  $r$ : -0,56;  $p$ = 0,14; Fig. 15Y).

Não foi observada correlação entre expressão proteica de ER $\alpha$  com número de TEBs (Pearson  $r$ : -0,37;  $p$ = 0,36; Fig. 15Aa), escore AB1 (Pearson  $r$ : -0,59;  $p$ = 0,12; Fig. 15Bb), escore AB2 (Pearson  $r$ : -0,52;  $p$ = 0,17; Fig. 15Cc), escore de lóbulos (Pearson  $r$ : -0,32;  $p$ = 0,43; Fig. 15Dd), escore DF1 (Pearson  $r$ : -0,55;  $p$ = 0,15; Fig. 15Ee).

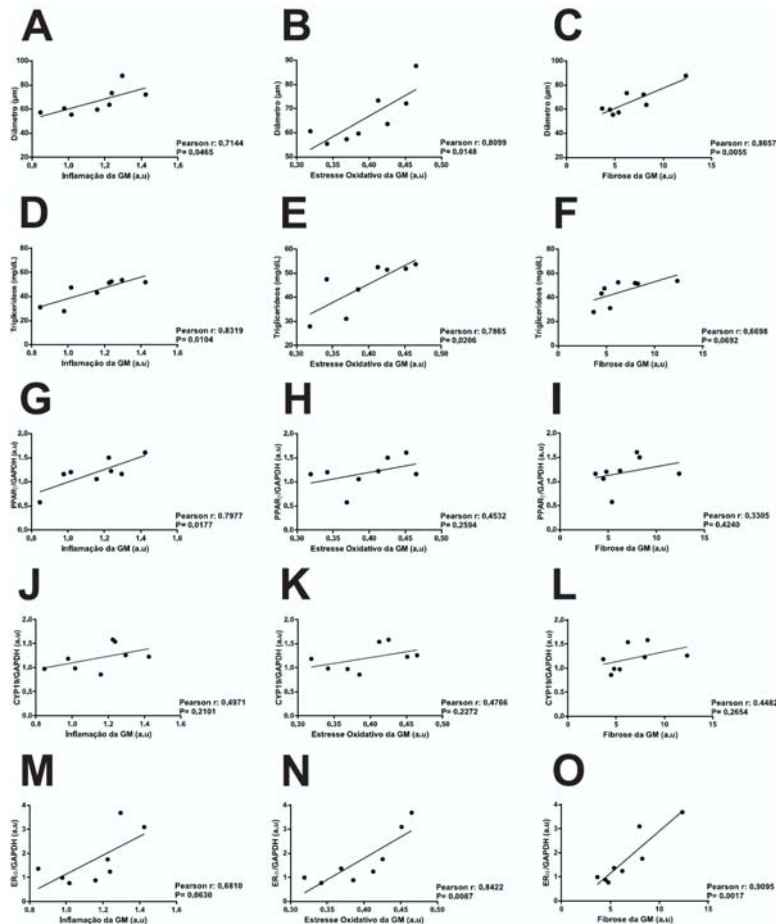
O diâmetro de adipócitos se correlacionou positivamente com a inflamação (Pearson  $r$ : 0,71;  $p$ = 0,04 Fig 16A), estresse oxidativo (Pearson  $r$ : 0,81;  $p$ = 0,01; Fig 16B) e fibrose (Pearson  $r$ : 0,87;  $p$ = 0,005; Fig 16C). Os níveis de triglicerídeos apresentaram-se fortemente correlacionados com a inflamação (Pearson  $r$ : 0,83;  $p$ = 0,01; Fig 16D) e estresse oxidativo (Pearson  $r$ : -0,79;  $p$ = 0,02; Fig 16E), mas não com a fibrose (Pearson  $r$ : 0,66;  $p$ = 0,06; Fig 16F).

A expressão proteica de PPAR $\gamma$  se relacionou positivamente com a inflamação (Pearson  $r$ : 0,80;  $p$ =0,01; Fig.16G), mas não com estresse oxidativo (Pearson  $r$ : 0,45;  $p$ = 0,25; Fig.16H) e fibrose (Pearson  $r$ : 0,33;  $p$ = 0,42; Fig.16I). Não foi observada correlação com associação linear entre a expressão proteica de CYP19 e inflamação (Pearson  $r$ : 0,49;  $p$ = 0,21; Fig.16J), estresse oxidativo (Pearson  $r$ : 0,47;  $p$ = 0,22; Fig.16K) e fibrose (Pearson  $r$ : 0,44;  $p$ = 0,26; Fig.16L). Correlação positiva foi encontrada entre a expressão proteica de ER $\alpha$  e estresse oxidativo (Pearson  $r$ : 0,84;  $p$ =0,008; Fig.16N) e fibrose (Pearson  $r$ : 0,91;  $p$ = 0,002; Fig. 16O), mas não com a inflamação (Pearson  $r$ : -0,68;  $p$ = 0,06; Fig. 16M).





**Figura 15: Correlação entre marcadores adipogênicos, morfológicos, expressão proteica de CYP19 e ER $\alpha$ .** Os valores do número de TEBs (A), escore AB1 (B), escore AB2 (C), escore de lóbulos (D), escore DF1 (E), expressão proteica de CYP19 (F) and  $\frac{PPAR\gamma}{GAPDH}$  correlacionados com o diâmetro dos adipócitos. Os valores do número de TEBs (H), escore AB1 (I), escore AB2 (J), escore de lóbulos (K), escore DF1 (L), expressão proteica de CYP19 (T) e  $\frac{PPAR\gamma}{GAPDH}$  correlacionados com a expressão proteica de CYP19. Os valores do número de TEBs (O), escore AB1 (P), escore AB2 (Q), escore de lóbulos (R), escore DF1 (S), expressão proteica de CYP19 (T) e  $\frac{PPAR\gamma}{GAPDH}$  correlacionados com a expressão proteica de ER $\alpha$ . Os valores do número de TEBs (V), escore AB1 (W), escore AB2 (X), escore de lóbulos (Y), escore DF1 (Z) foram correlacionados com a expressão proteica de CYP19. Os valores do número de TEBs (Aa), escore AB1 (Bb), escore AB2 (Cc), escore de lóbulos (Dd), escore DF1 (Ee) foram correlacionados com a expressão proteica de ER $\alpha$ . (n=8). A significância estatística ( $p < 0.05$ ) foi testada usando o teste Spearman's or Pearson's se uma distribuição de dados não-Gaussiana ou Gaussiana, foi respectivamente detectada.



**Figura 16. Correlação entre marcadores adipogênicos, inflamação, estresse oxidativo, fibrose e expressão proteica de CYP19 and ER $\alpha$ .** Os valores de inflamação da GM (A), estresse oxidativo (B) e fibrose (C) foram correlacionados com o diâmetro dos adipócitos. Os valores de inflamação da GM (D), estresse oxidativo (E) e fibrose (F) foram correlacionados com os níveis de triglicerídeos. Os valores de inflamação da GM (G), estresse oxidativo (H) e fibrose (I) foram correlacionados com a expressão proteica de PPAR $\gamma$ . Os valores de inflamação da GM (J), estresse oxidativo (K) e fibrose (L) foram correlacionados com a expressão proteica de CYP19. Os valores de inflamação da GM (M), estresse oxidativo (N) e fibrose (O) foram correlacionados com a expressão proteica de ER $\alpha$ . (n=8). A significância estatística ( $p<0.05$ ) foi testada usando o teste Spearman's or Pearson's se uma distribuição de dados não-Gaussiana ou Gaussiana, foi respectivamente detectada.

## 6.0 DISCUSSÃO

Este estudo fornece evidências pela primeira vez que a exposição ao TBT leva a anormalidades na GM, como resultado de, pelo menos em parte do efeito obesogênico sobre o tecido adiposo da GM de ratas *Wistar* adultas. Sendo observado atrofia das principais estruturas da GM, hipertrofia do tecido adiposo mamário e consequente processo inflamatório, acompanhado de estresse oxidativo e fibrose.

O tecido adiposo da GM das ratas expostas ao TBT ao longo de 15 dias apresentou anormalidades, e dentre estas, a inflamação (aumento quantitativo de mastócitos e na atividade de macrófagos). A inflamação por sua vez, apresentou correlação positiva com os parâmetros do tecido adiposo que se mostraram alterados no grupo TBT, como o diâmetro dos adipócitos da GM, os níveis de TG e a expressão proteica de PPAR $\gamma$ . Além disso, esses mesmos parâmetros (com exceção do PPAR $\gamma$ ) também apresentaram correlação positiva com o estresse oxidativo. Junto destas complicações, características de remodelamento da GM foram observadas, somadas de um aumento nos parâmetros que sugerem um evento fibrótico na GM das ratas TBT. Assim sendo, esses dados sugerem que os efeitos obesogênicos do TBT na gordura da GM podem de alguma forma estar associados com as alterações observadas nas ratas do grupo TBT. Observou-se, além disso, a expressão elevada das proteínas ER $\alpha$  e CYP19 (aromatase) na GM das ratas TBT.

Sabe-se por meio de investigações prévias que, o TBT é um composto obesogênico (subclasse dos EDC), capaz de aumentar o risco de obesidade e complicações metabólicas por ativação anormal de RXR e PPAR $\gamma$  e por

modulação anormal de outras vias de sinalização (DE ARAÚJO et al., 2018b; FREITAS-LIMA et al., 2018; GRÜN et al., 2006; SHOUCRI et al., 2017).

O aumento na deposição adiposa é uma característica comum após a exposição ao TBT em diferentes modelos (BERTULOSO et al., 2015; GRÜN et al., 2006; PENZA et al., 2011). Por exemplo, após a exposição ao TBT na concentração de 100 ng/Kg/dia (por 15 dias), ratas tiveram aumento da massa adiposa (COUTINHO et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018b; MERLO et al., 2016).

Diversos estudos com diferentes EDCs reportaram que os mesmos afetam o desenvolvimento epitelial e as células adiposas mamárias em roedores (LA MERRILL et al., 2009; VANDENBERG et al., 2012). Entretanto, poucos estudos avaliaram os efeitos dos OTs sobre a GM tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro* (BALAS et al., 2011; CARDARELLI et al., 1984; GRÜN et al., 2006; SILVA et al., 2013) (Tabela 2). Além disso, não encontramos estudos avaliando especificamente os parâmetros da GM *in vivo*. Por esta razão, comparamos o efeito encontrado em nosso modelo com outros estudos que utilizaram diferentes tipos de obesogênicos como o BPA, conhecido como um potencial ativador de PPAR $\gamma$  assim como o TBT (GRÜN et al., 2006; HEINDEL; NEWBOLD; SCHUG, 2015).

Camundongos adultos expostos a baixas doses de BPA a (25ng/Kg/dia) sofreram estimulação do crescimento mamário, com aumento no número de TEBs e da ramificação lateral. Contudo, a exposição a altas doses (250 ng/Kg/dia) resultou em um efeito oposto, reduzindo o crescimento longitudinal e lateral da GM (MUÑOZ-DE-TORO et al., 2005). O efeito encontrado com alta dose de BPA se mostrou similar ao encontrado neste estudo, onde observamos a redução dos parâmetros morfológicos, devido a diminuição quantitativa de TEBs, AB1 e 2 e lóbulos, sugerindo atrofia da GM das ratas expostas ao TBT. Visto que houve prejuízo no ciclo estral com maior duração da fase de MD (DE ARAÚJO et al., 2018b; PODRATZ et al., 2015) ao longo da exposição ao TBT, é esperado a redução dos níveis de E<sub>2</sub> circulante, o que poderia explicar a redução das estruturas da GM (MACIAS; HINCK, 2012). Além disso, recentemente foi mostrado o TBT altera os níveis séricos de progesterona, bem

e de testosterona circulante em ratas (DE ARAÚJO et al., 2018b; SENA et al.,

*Modelo/OT/Dose/ Tempo de exposição*

---

2017).

***Tabela 2: Resumo das alterações causadas na GM por ação dos OTs.***

<b>Parâmetros da</b>	Camundongos/TBT(0.5 mg/kg/dia)/	MCF-7, MDA-MB-231, MTSV-17/OTCs (0.001-10µM)/48-72hrs	MCF-7/TBT (0-1000 nM)/20-24hrs	MCF-7/ TBT, TPT/10 <sup>-12</sup> -10 <sup>6</sup> M/ 24-72hrs	MCF-7, MDA-MB-231/ TBT, TPT/200-800 nM/72 hrs	<b>Ratas/ TBT/ 100ng/Kg/ dia/ 15 dias</b>
<b>Glândula Mamária</b>	DG 12-21					
<b>Morfologia</b>						
Peso da GM	NR	NA	NA	NA	NA	↑
TEBs	NR	NA	NA	NA	NA	↓
Lóbulos	NR	NA	NA	NA	NA	↓
Diferenciação (ABs, DF1)	NR	NA	NA	NA	NA	↓
<b>Metabolismo lipídico</b>						
Adipócitos (Nº/diâmetro)	NR	NR	NR	NR	NR	↓/ ↑
Triglicerídeos da GM	NR	NR	NR	NR	NR	↑
Deposição lipídica (Oil Red)	↑	NR	NR	NR	NR	<b>NR</b>
Expressão de PPAR <sub>γ</sub>	NR	NR	NR	NR	NR	<b>NR</b>
<b>Inflamação</b>						
Nº de mastócitos	NR	NA	NA	NA	NA	↑
Macrófagos (atividade/expressão)	NR	NA	NA	NA	NA	↑
<b>Estresse oxidativo</b>						
DHE	NR	NR	NR	NR	NR	↑
TBARS	NR	NR	NR	NR	NR	↑
GSH	NR	NR	NR	NR	NR	↓
<b>Fibrose</b>						
Deposição de colágeno	NR	NA	NA	NA	NA	↑
Expressão COL1/3	NR	NA	NA	NA	NA	↑
<b>Referências</b>	Grün <i>et al</i> , 2006	Balas <i>et al</i> , 2011, 2012	Sharan <i>et al</i> , 2013	Fickova; Macho; Brtko, 2014	Hunakova <i>et al</i> , 2015	<b>Este estudo</b>

**Tabela 2:** GM: Glândula mamária; DG: Dia gestacional. TEBs: Botões terminais; ABs: Terminais alveolares; DF1: Escore de diferenciação 1 PPAR<sub>γ</sub>: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; DHE:

*Dihidroetídio* ; *TBARS*: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; *GSH*: Glutathione reduzida; *COL1/3*: colágeno  $\alpha 1$  tipo I 1 and 3; *OTs*: Organotins; *TBT*: Tributilestanho; *TPT*: Trifenilestanho; *DPT*: Difenilestanho; *OTCs*: Complexos de TBT, TPT, DPT; *MCF-7*: células positivas para receptor de estrgênio; *MDA-MB-231*: breast, células negativas para receptor de estrogênio; *MTSV-17*: células epiteliais de glândula mamária normais aplicável. hrs: horas. Nº: número.

Já foi reportado em nossos estudos o aumento anormal da massa gorda com hipertrofia de adipócitos, do perfil lipídico e da expressão de PPAR $\gamma$  após a exposição a 100 ng/Kg/dia de TBT por 15 dias em ratas (BERTULOSO et al., 2015; FREITAS-LIMA et al., 2018). Além disso, também foi reportado deposição ectópica de gordura e sinalização irregular em diferentes tecidos de roedores, tais como fígado, adrenal e ovários (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013b; DE ARAÚJO et al., 2018b; MERLO et al., 2016). Corroborando com os trabalhos citados, este estudo apresentou adipócitos hipertróficos, elevados níveis de triglicerídeos e maior expressão de PPAR $\gamma$ , além de correlação positiva com o peso mamário, o que permite sugerir que o TBT apresenta efeito obesogênico no tecido adiposo da GM.

Apesar da hipertrofia do tecido adiposo mamário como mencionado acima, não foi observado diferença no peso corporal entre os dois grupos utilizados neste estudo, diferente do já reportado por Bertuloso *et al.*, (2015), Sena *et al.* (2017) e de Araújo *et al.* 2018. Entretanto, outros trabalhos mostraram que os animais expostos ao TBT também não ganharam peso suficiente (PODRATZ et al., 2012) para evidenciar diferença, sendo reportado no entanto, o aumento da adiposidade corporal quando comparados aos controles, ou seja, não impreterivelmente será observado o aumento na massa total corporal, mas tende a ser observado aumento da massa adiposa (GRÜN et al., 2006; PENZA et al., 2011).

Os parâmetros normais do epitélio mamário como crescimento, diferenciação, lactação e involução estão intimamente relacionados com o tecido adiposo adjacente em modelos mamíferos (HOVEY; AIMO, 2010; SAKAKURA et al.,

1987). Ambos, dieta e compostos químicos exógenos tem mostrado impactar tanto o epitélio quanto o estroma mamário. Por exemplo, excesso de tecido adiposo mamário e elevados níveis de triglicerídeos são associados com prejuízo no desenvolvimento e diferenciação alveolar, lactogenese, constituição do leite, bem como reduzida massa parenquimal em camundongos fêmea com obesidade induzida por dieta (FLINT, 2005). Além disso, ratas grávidas tratadas com glutamato monossódico apresentaram aumentado conteúdo adipocitário e redução no desenvolvimento alveolar (CANCIAN et al., 2016). De forma consistente com esses achados, nós observamos neste estudo uma forte correlação negativa entre os níveis de triglicerídeos do tecido mamário com o número de TEBs, AB1, lóbulos e escore DF1 nas ratas TBT, apontando para o resultado da ação obesogênica sobre as anormalidades observadas neste modelo.

De fato, o TBT é capaz de induzir inflamação em diversos tecidos (COUTINHO et al., 2016; MITRA et al., 2013). A condição de expansão da massa gorda anormal como resultado da exposição ao TBT geralmente vem acompanhada de inflamação de baixo grau, e perfil de adipocinas alterado (FREITAS-LIMA et al., 2018). Como observado neste estudo e previamente por outros, o TBT aumenta o número de mastócitos e de macrófagos em vários tecidos (BERTULOSO et al., 2015; FREITAS-LIMA et al., 2018). A massa adiposa da GM é também suscetível ao aumento da inflamação na obesidade, como mostrado pela relação entre a presença de macrófagos e adiposidade (SUBBARAMAIAH et al., 2011). Elevada atividade de NAG e expressão ED1 (marcador macrofágico) foram observadas na GM das ratas TBT.

Além disso, uma correlação fortemente positiva entre o diâmetro adipocitário, níveis de triglicerídeos, expressão de PPAR $\gamma$  e a inflamação foi encontrada nas ratas expostas ao TBT. Outros relatos sugerem que as citocinas da GM inflamada na obesidade podem estimular a produção estrogênica pela atividade da aromatase, levando a anormalidades e aumentado risco e câncer (BROWN, 2014; HARADA; UTSUMI; TAKAGI, 1993). Neste trabalho observamos elevada expressão proteica de ER $\alpha$  e CYP19 na GM das ratas TBT. Uma correlação negativa foi encontrada entre a expressão de CYP19 e o escore AB1 e com o escore DF1, sugerindo seu papel sobre a morfologia



anormal da GM. Uma correlação positiva foi observada entre o diâmetro dos adipócitos mamários e a expressão proteica de ER $\alpha$ , peso e estresse oxidativo mamário. Assim sendo, esses dados sugerem que a ação do TBT tem associação com a inflamação e expressão alterada de ER $\alpha$  e CYP19 na GM.

Já se sabe da associação entre a exposição ao TBT com disfunção celular via estresse oxidativo em pelo menos quatro tecidos como o vascular, renal, adrenal e hipófise (COUTINHO et al., 2016; MERLO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014). Nosso trabalho estende esses achados para a GM, demonstrando um aumento nos níveis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e TBARS, seguido de redução da atividade de GSH da GM nas ratas TBT, sugerindo aumento do estresse oxidativo nesses animais. Reforçando esses achados uma correlação positiva entre a hipertrofia dos adipócitos, níveis de triglicerídeos e estresse oxidativo foi observada.

Além disso, estudos anteriores mostraram que o TBT induz o dano celular, o que pode levar a um remodelamento tecidual com deposição de tecido fibroso (DE ARAÚJO et al., 2018b). Assim sendo, após a avaliação da deposição de tecido fibroso no tecido mamário observamos aumento na deposição de colágeno em torno dos ductos mamários nas ratas TBT. Para determinar o caráter da deposição lipídica realizamos a análise de expressão proteica de COL1A1 e COL3A1, as quais se mostraram aumentadas nos animais do grupo TBT. Com base nesses achados é sugestivo que o TBT possa induzir fibrose na GM.

## 7.0 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso modelo demonstra que a exposição ao TBT tem potencial de desencadear anormalidades na GM de ratas adultas, onde é demonstrado mais uma vez sua influência sobre o tecido adiposo, marcadores adipogênicos, e seu envolvimento com inflamação, estresse oxidativo e fibrose. Além disso, a inflamação anormal da GM pode estar associada com aumento na expressão de ER $\alpha$  e CYP19. Esse estudo por sua vez, permite ampliar os conhecimentos do efeito obesogênico do TBT sobre a GM, via regulação anormal dos marcadores adipogênicos em ratas adultas.

## 8.0 REFERÊNCIAS

- ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 346–353, 2011.
- ANDRES, A. C.; STRANGE, R. Apoptosis in the Estrous and Menstrual Cycles. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 221–228, 1999.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 292–308, 2008.
- APPEL, K. E. Organotin compounds: Toxicokinetic aspects. **Drug Metabolism Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 3–4, p. 763–786, 2004.
- ASIMAKOPOULOS, B. Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis: It is Time for Revision. **Human Genetics & Embryology**, [s. l.], v. 02, n. 01, p. 1, 2012.
- BALAS, V. I.; VERGINADIS, I. I.; GEROMICHALOS, G. D.; KOURKOUMELIS, N.; MALE, L.; HURSTHOUSE, M. B.; REPANA, K. H.; YIANNAKI, E.; CHARALABOPOULOS, K.; BAKAS, T.; HADJIKAKOU, S. K. Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin(IV) complex with 2-thiobarbituric acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 2835–2844, 2011.
- BARATTA, M.; MIRETTI, S.; MACCHI, E.; ACCORNERO, P.; MARTIGNANI, E. Mammary Stem Cells in Domestic Animals: The Role of ROS. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 6, 2018.
- BATISTA, R. M.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G. Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 566–567, p. 446–453, 2016.
- BEAUMONT, A. R.; BUDD, M. D. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 402–405, 1984.

BEAUMONT, A. R.; NEWMAN, P. B. Low levels of tributyl tin reduce growth of marine micro-algae. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 457–461, 1986.

BECKER, A.; SOLIMAN, K. F. A. The role of intracellular glutathione in inorganic mercury-induced toxicity in neuroblastoma cells. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1677–1684, 2009.

BERTULOSO, B. D.; PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; DE ARAÚJO, J. F. P.; LIMA, L. C. F.; DE MIGUEL, E. C.; DE SOUZA, L. N.; GAVA, A. L.; DE OLIVEIRA, M.; MIRANDA-ALVES, L.; CARNEIRO, M. T. W. D.; NOGUEIRA, C. R.; GRACELI, J. B. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 235, n. 1, p. 45–59, 2015.

BLABER, S. J. M. The occurrence of penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. **Journal of Molluscan Studies**, [s. l.], v. 39, n. 2–3, p. 231–233, 1970.

BORGES, C. de L. L.; FERNANDEZ, M. A. dos S.; CASTRO, Í. B.; FILLMANN, G. Organotin pollution from pleasure craft at paraty, a tourist area of southeastern brazil: Amelioration or interference? **Brazilian Journal of Oceanography**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 177–186, 2013.

BRASIL. RN nº15/2013 - Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. **Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal**, Brasil, 2013. p. 20.

BRISKEN, C.; ATACA, D. Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 181–195, 2015.

BROWN, K. A. Impact of obesity on mammary gland inflammation and local estrogen production. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 183–189, 2014.

CANCIAN, C. R. C.; LEITE, N. C.; MONTES, E. G.; FISHER, S. V.;

WASELCOSKI, L.; STAL, E. C. L.; CHRISTOFORO, R. Z.; GRASSIOLLI, S. Histological and metabolic state of dams suckling small litter or MSG-treated pups. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2016, p. 1–12, 2016.

CAPUCO, A. V.; CONNOR, E. E.; WOOD, D. L. Regulation of Mammary Gland Sensitivity to Thyroid Hormones During the Transition from Pregnancy to Lactation. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 233, n. 10, p. 1309–1314, 2008.

CARDARELLI, N. F.; CARDARELLI, B. M.; LIBBY, E. P.; DOBBINS, E. © ORGANOTIN IMPLICATIONS IN ANTICARCINOGENESIS . EFFECTS OF SEVERAL ORGANOTINS ON TUMOUR GROWTH RATE IN MICE regimen is shown in Table 2 . Measurements were made externally and refer. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 209–214, 1984.

CARTON, J. **Oxford Handbook of Clinical Pathology**. [s.l.] : Oxford University Press, 2012. v. 1

CASTRO, Í. B.; FILLMANN, G. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 955–960, 2012.

CESBRA QUÍMICA. **Cloreto de Tri-butil Estanho (TBTCl)**. 2018. Disponível em: <<https://2122-br.all.biz/o-cloreto-de-tri-butil-estanho-tbtcl-cesbra-g3678>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

CHAMARD-JOVENIN, C.; THIEBAUT, C.; CHESNEL, A.; BRESSO, E.; MOREL, C.; SMAIL-TABBONE, M.; DEVIGNES, M. D.; BOUKHOBZA, T.; DUMOND, H. Low-dose alkylphenol exposure promotes mammary epithelium alterations and transgenerational developmental defects, but does not enhance tumorigenic behavior of breast cancer cells. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

CHAMORRO-GARCÍA, R.; SAHU, M.; ABBEY, R. J.; LAUDE, J.; PHAM, N.; BLUMBERG, B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem

cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 359–366, 2013. a.

CHAMORRO-GARCÍA, R.; SAHU, M.; ABBEY, R. J.; LAUDE, J.; PHAM, N.; BLUMBERG, B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 359–366, 2013. b.

CHANDRA, S. A.; CLINE, J. M.; ADLER, R. R. Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 969–983, 2010.

CHESNEL, A.; CHAMARD-JOVENIN, C.; CHESNEL, A.; MOREL, C.; DJERMOUNE, E.; BOUKHOBZA, T.; DUMOND, H. Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ERalpha36 overexpression. **PLoS ONE**, [s. l.], p. 1–18, 2017.

CHUA, A. C. L.; HODSON, L. J.; MOLDENHAUER, L. M.; ROBERTSON, S. A.; INGMAN, W. V. Dual roles for macrophages in ovarian cycle-associated development and remodelling of the mammary gland epithelium. **Development**, [s. l.], v. 137, n. 24, p. 4229–4238, 2010.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. DIRECTIVA 2002/62/DA COMISSÃO CE2002. p. 58–59.

CONAMA. RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005Brasil, 2005. p. 23.

CONAMA. RESOLUÇÃO CONAMA N° 454, DE 1° DE NOVEMBRO DE 2012.Brasil, 2012. p. 18.

COSTA, M.; FERNANDEZ, M. A.; BARBIERO, D. C.; MELO, F. T. V. De; OTEGUI, M. B. P.; FERREIRA, B. S. First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 145–148, 2008.

COSTA, M.; MARDEGAN, B. S.; ZAMPROGNO, G. C.; PEDRUZZI, F. C.; MORAIS, L. De; DALBEM, G. B.; SILVA, D. A. Da; GRACELI, J. B. Penis Malformations in *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1792) and *Leucozoniacellata* (Gmelin, 1791) in a TBT Contaminated Region from Brazil. **Aquatic Science and Technology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 52, 2014.

COSTA, M.; ZAMPROGNO, G. C.; OTEGUI, M. B. P.; DE MORAIS, L.; PEDRUZZI, F. C.; DALBEM, G. B.; DA SILVA, D. A.; RESENDE, A. C. B. A temporal and spatial monitoring of organotin pollution in a harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using *Leucozonia nassa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 189, n. 12, p. 650, 2017.

COUSSENS, L. M.; POLLARD, J. W. Leukocytes in Mammary Development and Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. a003285–a003285, 2011.

COUTINHO, J. V. S.; FREITAS-LIMA, L. C.; FREITAS, F. F. C. T.; FREITAS, F. P. S.; PODRATZ, P. L.; MAGNAGO, R. P. L.; PORTO, M. L.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; PAIVA-MELO, F. D.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GAVA, A. L.; GRACELI, J. B. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 260, p. 52–69, 2016.

COWIN, P.; WYSOLMERSKI, J. Molecular Mechanisms Guiding Embryonic Mammary Gland Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. a003251–a003251, 2010.

DAFFORN, K. A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 453–465, 2011.

DALPIAZ, P. L. M.; LAMAS, A. Z.; CALIMAN, I. F.; MEDEIROS, A. R. S.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; ANDRADE, T. U.; ALVES, M. F.; CARMONA, A. K.; BISSOLI, N. S. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 1–10, 2020.

I.], v. 46, n. 2, p. 171–177, 2013.

DAVIS, B.; FENTON, S. **Toxicologic Pathology - Mammary Gland**. 3. ed. Porto Alegre: Elsevier, 2013. a.

DAVIS, B.; FENTON, S. Mammary Gland. In: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. 3. ed. Boston. p. 2665–2694.

DE ARAÚJO, J. F. P.; PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; SARMENTO, I. V.; DA COSTA, C. S.; NIÑO, O. M. S.; FARIA, R. A.; FREITAS LIMA, L. C.; GRACELI, J. B. **Organotin exposure and vertebrate reproduction: A review**, *Frontiers Media SA*, 2018. a.

DE ARAÚJO, J. F. P.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; MERLO, E.; FREITAS-LIMA, L. C.; AYUB, J. G. M.; PEREIRA, A. F. Z.; SANTOS-SILVA, A. P.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 295, p. 99–114, 2018. b.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; HILAKIVI-CLARKE, L. Changes in Mammary Gland Morphology and Breast Cancer Risk in Rats. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 21, n. 44, p. 2–4, 2010.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. **Journal of Environmental and Public Health**, [s. l.], v. 2012, 2012.

DEL BRIO, F.; COMMENDATORE, M.; CASTRO, I. B.; GOMES COSTA, P.; FILLMANN, G.; BIGATTI, G. Distribution and bioaccumulation of butyltins in the edible gastropod *Odontocymbiola magellanica*. **Marine Biology Research**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 608–620, 2016.

DIRETORIA DE PORTOS E COSTAS. NORMAM-23/DPC.Brasil, 2007. p. 1.

EDDIE, S. L.; KIM, J. J.; WOODRUFF, T. K.; BURDETTE, J. E. Microphysiological modeling of the reproductive tract: A fertile endeavor. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 239, n. 9, p. 1192–1202, 2014.

EKLUND, B.; ELFSTROM, M.; BORG, H. Tributyltin Originates from Pleasure

Boats in Sweden in Spite of Firm Restrictions. **Open Environmental Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 124–132, 2008.

EKLUND, B.; ELFSTRÖM, M.; GALLEGÓ, I.; BENGTSSON, B. E.; BREITHOLTZ, M. Biological and chemical characterization of harbour sediments from the Stockholm area. **Journal of Soils and Sediments**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 127–141, 2009.

ESFA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 102, 2004.

ESLAMI, H.; BATAVANI, R. A.; ASR I-REZAEI, S.; HOBENAGHI, R. Changes of stress oxidative enzymes in rat mammary tissue, blood and milk after experimental mastitis induced by E. coli lipopolysaccharide. **Veterinary research forum**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 131–6, 2015.

FLINT, D. J. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 288, n. 6, p. E1179–E1187, 2005.

FOX, J. G. Preanesthesia Anesthesia Analgesia and Euthanasia. In: **Laboratory Animal Medicine**. 2. ed. [s.l.] : Academic Press, 2015. p. 992.

FREITAS-LIMA, L. C.; MERLO, E.; CAMPOS ZICKER, M.; NAVIA-PELAEZ, J. M.; DE OLIVEIRA, M.; DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI, L.; NOGUEIRA, C. R.; VERSIANI MATOS FERREIRA, A.; SOUSA SANTOS, S. H.; BERNARDES GRACELI, J. Tributyltin impacts in metabolic syndrome development through disruption of angiotensin II receptor signaling pathways in white adipose tissue from adult female rats. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 299, p. 21–31, 2018.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 767–777, 1986.

GOULD, E. M. The effect of ketamine/xylazine and carbon dioxide on plasma luteinizing hormone releasing hormone and testosterone concentrations in the



male Norway rat. **Laboratory Animals**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 483–488, 2008.

GRIMÓN, R. O. R.; OSORIO, M. F. A.; FREITAS, D. M. De; CASTRO, Í. B. Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. **Marine Policy**, [s. l.], v. 69, p. 24–31, 2016.

GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, [s. l.], v. 202, n. 3, p. 145–158, 2004.

GRÜN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D. M.; KANNO, J.; IGUCHI, T.; BLUMBERG, B. Endocrine-Disrupting Organotin Compounds Are Potent Inducers of Adipogenesis in Vertebrates. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2141–2155, 2006.

HALLAS, L. E.; MEANS, J. C.; COONEY, J. J. Methylation of Tin by Estuarine Microorganisms. **Science**, [s. l.], v. 215, n. 4539, p. 1505–1507, 1982.

HANNON, P. R.; FLAWS, J. A. The effects of phthalates on the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 6, n. FEB, p. 1–19, 2015.

HARADA, N.; UTSUMI, T.; TAKAGI, Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 90, n. 23, p. 11312–6, 1993.

HEINDEL, J. J.; JOBLING, S.; KIDD, K. A.; ZOELLER, R. T. **Endocrine Disrupting Chemicals - 2012**. Geneva: World Health Organization, 2012.

HEINDEL, J. J.; NEWBOLD, R.; SCHUG, T. T. Endocrine disruptors and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 653–661, 2015.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Signaling pathways in mammary gland development. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 1, n. 1534–5807 (Print), p. 467–475, 2001.

HINDMAN, A. R.; MO, X. M.; HELBER, H. L.; KOVALCHIN, C. E.;

RAVICHANDRAN, N.; MURPHY, A. R.; FAGAN, A. M.; ST JOHN, P. M.; BURD, C. J. Varying susceptibility of the female mammary gland to in utero windows of bpa exposure. **Endocrinology**, [s. l.], v. 158, n. 10, p. 3435–3447, 2017.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment: a review. **Applied Geochemistry**, [s. l.], v. 16, n. May, p. 719–743, 2001.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, [s. l.], v. 207, n. 4, p. 604–611, 1999.

HODSON, L. J.; CHUA, A. C. L.; EVDOKIOU, A.; ROBERTSON, S. A.; INGMAN, W. V. Macrophage Phenotype in the Mammary Gland Fluctuates over the Course of the Estrous Cycle and Is Regulated by Ovarian Steroid Hormones<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 1–8, 2013.

HOVEY, R. C.; AIMO, L. Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 279–290, 2010.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic and Histochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 79–87, 2005.

HUNAKOVA, L.; MACEJOVA, D.; TOPOROVA, L.; BRŤKO, J. Anticancer effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 6701–6708, 2016.

HVID, H.; THORUP, I.; SJÖGREN, I.; OLEKSIEWICZ, M. B.; JENSEN, H. E. Mammary gland proliferation in female rats: Effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. **Experimental and Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 321–332, 2012.

INMAN, J. L.; ROBERTSON, C.; MOTT, J. D.; BISSELL, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment.

**Development**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 1028–1042, 2015.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION. International Convention on the control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, 2001. In: (The Stationery Office Limited, Ed.) 2001, London. **Anais...** London: Foreign & Commonwealth Office, 2001.

KHETAN, S. K. Environmental Endocrine Disruptors. In: **Endocrine Disruptors in the Environment**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 1–26.

KHOKHA, R.; WERB, Z. Mammary Gland Reprogramming: Metalloproteinases Couple Form with Function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. a004333–a004333, 2011.

KOBAYASHI, A.; BEHRINGER, R. R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 969–980, 2003.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 235–248, 2004.

KOTAKE, Y. Molecular Mechanisms of Environmental Organotin Toxicity in Mammals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 1892–1897, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.; ROBBINS, S. L. (Stanley L. **Robbins basic pathology**. [s.l.] : Elsevier/Saunders, 2013.

LA MERRILL, M.; KURUVILLA, B. S.; POMP, D.; BIRNBAUM, L. S.; THREADGILL, D. W. Dietary fat alters body composition, mammary development, and cytochrome P450 induction after maternal TCDD exposure in DBA/2J mice with low-responsive Aryl hydrocarbon receptors. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 117, n. 9, p. 1414–1419, 2009.

LAGERSTRÖM, M.; STRAND, J.; EKLUND, B.; YTREBERG, E. Total tin and organotin speciation in historic layers of antifouling paint on leisure boat hulls.

**Environmental Pollution**, [s. l.], v. 220, p. 1333–1341, 2017.

LI, B.; GUO, J.; XI, Z.; XU, J.; ZUO, Z.; WANG, C. Tributyltin in male mice disrupts glucose homeostasis as well as recovery after exposure: mechanism analysis. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

LIMA, L. C. F.; PORTO, M. L.; CAMPAGNARO, B. P.; TONINI, C. L.; NOGUEIRA, B. V.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 96, 2012.

LIMAVERDE, A. M.; DE L. REBELLO WAGENER, A.; FERNANDEZ, M. A.; DE L. SCOFIELD, A.; COUTINHO, R. Stramonita haemastoma as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 384–398, 2007.

LITHGOW, D. Chronic Inflammation and Breast Pathology: A Theoretical Model. **Biological Research For Nursing**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 118–129, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

LUND, L. R.; RØMER, J.; THOMASSET, N.; SOLBERG, H.; PYKE, C.; BISSELL, M. J.; DANØ, K.; WERB, Z. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 181–93, 1996.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 533–557, 2012.

MACON, M. B.; FENTON, S. E. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 43–61, 2013.

MANSEVISI, F.; GOPALAKRISHNAN, K.; TIBALDI, E.; HYSI, A.; IEZZI, M.; LAMBERTINI, L.; TEITELBAUM, S.; CHEN, J.; BELPOGGI, F. Effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on reproduction and

mammary gland development in female Sprague-Dawley rats. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 54, n. 18, p. 110–119, 2015.

MATTOS, Y.; STOTZ, W. B.; ROMERO, M. S.; BRAVO, M.; FILLMANN, G.; CASTRO, Í. B. Butyltin contamination in Northern Chilean coast: Is there a potential risk for consumers? **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 595, p. 209–217, 2017.

MCLEAN, A. C.; VALENZUELA, N.; FAI, S.; BENNETT, S. A. L. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 67, p. 4–9, 2012.

MEADOR, J. An Analysis of Photobehavior of Daphnia Magna Exposed to Tributyltin. **OCEANS '86**, [s. l.], p. 1213–1218, 1986.

MENG, P. J.; LIN, J.; LIU, L. L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 90, n. SUPPL. 1, p. 8–15, 2009.

MERLO, E.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; DE ARAÚJO, J. F. P.; LIMA, L. C. F.; ALVES, I. S. S.; GAMA-DE-SOUZA, L. N.; PELIÃO, R.; RODRIGUES, L. C. M.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; PIRES, R. G. W.; MARTINS-SILVA, C.; ALARCON, T. A.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 8, p. 2978–2995, 2016.

MITRA, S.; GERA, R.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood–brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: An in vivo and in vitro study. **Toxicology**, [s. l.], v. 310, p. 39–52, 2013.

MONSEFI, M.; ABEDIAN, M.; AZARBAHRAM, Z.; ASHRAF, M. J. *Salvia officinalis* L. induces alveolar bud growing in adult female rat mammary glands. **Avicenna journal of phytomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 560–7, 2015.

MOORE, A. M.; PRESCOTT, M.; CAMPBELL, R. E. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic

ovarian syndrome. **Endocrinology**, [s. l.], v. 154, n. 2, p. 796–806, 2013.

MUÑOZ-DE-TORO, M.; MARKEY, C. M.; WADIA, P. R.; LUQUE, E. H.; RUBIN, B. S.; SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary Gland Development in Mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 9, p. 4138–4147, 2005.

NATH, M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: A review. **Applied Organometallic Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 598–612, 2008.

NEED, E. F.; ATASHGARAN, V.; INGMAN, W. V.; DASARI, P. Hormonal regulation of the immune microenvironment in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 229–239, 2014.

NICHOLSON, J. W. The Early History of Organotin Chemistry. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 66, p. 621–623, 1989.

OLIVEIRA, R. de C.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 9–24, 2010.

OSBORNE, G.; RUDEL, R.; SCHWARZMAN, M. Evaluating chemical effects on mammary gland development: A critical need in disease prevention. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 54, p. 148–155, 2015.

PACCOLA, C. C.; RESENDE, C. G.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S. M.; CIPRIANO, I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 677–683, 2013.

PAINE, I. S.; LEWIS, M. T. The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 93–108, 2017.

PAZ-VILLARRAGA, C. A.; CASTRO, Í. B.; MILOSLAVICH, P.; FILLMANN, G. Venezuelan Caribbean Sea under the threat of TBT. **Chemosphere**, [s. l.], v. 119, p. 704–710, 2015.

PENZA, M.; JEREMIC, M.; MARRAZZO, E.; MAGGI, A.; CIANA, P.; RANDO,

G.; GRIGOLATO, P. G.; DI LORENZO, D. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 255, n. 1, p. 65–75, 2011.

PETRACCO, M.; CAMARGO, R. M.; BERENGUEL, T. A.; DE ARRUDA, N. C. L. P.; DEL MATTO, L. A.; AMADO, L. L.; CORBISIER, T. N.; CASTRO, Í. B.; TURRA, A. Evaluation of the use of *Olivella minuta* (Gastropoda, Olividae) and *Hastula cinerea* (Gastropoda, Terebridae) as TBT sentinels for sandy coastal habitats. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 187, n. 7, p. 440, 2015.

PLANTE, I.; STEWART, M. K. G.; LAIRD, D. W. Evaluation of Mammary Gland Development and Function in Mouse Models. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 53, p. 2–6, 2011.

PODRATZ, P. L.; FILHO, V. S. D.; LOPES, P. F. I.; SENA, G. C.; MATSUMOTO, S. T.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; MIGUEL, E. D. C.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, [s. l.], v. 75, n. 16–17, p. 1035–1046, 2012.

PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; SENA, G. C.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; DA COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; MIGUEL, E. de C.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 57, p. 29–42, 2015.

RANTAKOKKO, P.; MAIN, K. M.; WOHLFART-VEJE, C.; KIVIRANTA, H.; AIRAKSINEN, R.; VARTIAINEN, T.; SKAKKEBÆK, N. E.; TOPPARI, J.; VIRTANEN, H. E. Association of placenta organotin concentrations with congenital cryptorchidism and reproductive hormone levels in 280 newborn boys from Denmark and Finland. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1647–1660, 2013.

RODRIGUES, S. M. L.; XIMENES, C. F.; DE BATISTA, P. R.; SIMÕES, F. V.;

COSER, P. H. P.; SENA, G. C.; PODRATZ, P. L.; DE SOUZA, L. N. G.; VASSALLO, D. V.; GRACELI, J. B.; STEFANON, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 225, n. 3, p. 378–385, 2014.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Development of the human breast. **Maturitas**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 2–15, 2004.

SAHA, J. K.; XIA, J.; GRONDIN, J. M.; ENGLE, S. K.; JAKUBOWSKI, J. A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 230, n. 10, p. 777–784, 2005.

SAKAKURA, T.; KUSANO, I.; KUSAKABE, M.; INAGUMA, Y.; NISHIZUKA, Y. Biology of mammary fat pad in fetal mouse: capacity to support development of various fetal epithelia in vivo. **Development**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 421–430, 1987.

SALAZAR, M. H.; SALAZAR, S. M. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 32, n. 1–4, p. 131–150, 1991.

SAPOUCKEY, S. A.; KASSOTIS, C. D.; NAGEL, S. C.; VANDENBERG, L. N. Prenatal Exposure to Unconventional Oil and Gas Operation Chemical Mixtures Altered Mammary Gland Development in Adult Female Mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 1277–1289, 2018.

SENA, G. C.; FREITAS-LIMA, L. C.; MERLO, E.; PODRATZ, P. L.; DE ARAÚJO, J. F. P.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; ZICKER, M. C.; FERREIRA, A. V. M.; TAKIYA, C. M.; DE LEMOS BARBOSA, C. M.; MORALES, M. M.; SANTOS-SILVA, A. P.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 319, p. 22–38, 2017.

SHARAN, S.; NIKHIL, K.; ROY, P. Effects of low dose treatment of tributyltin on



the regulation of estrogen receptor functions in MCF-7 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 269, n. 2, p. 176–186, 2013.

SHOUCRI, B. M.; MARTINEZ, E. S.; ABREO, T. J.; HUNG, V. T.; MOOSOVA, Z.; SHIODA, T.; BLUMBERG, B. Retinoid x receptor activation alters the chromatin landscape to commit mesenchymal stem cells to the adipose lineage. **Endocrinology**, [s. l.], v. 158, n. 10, p. 3109–3125, 2017.

SILVA, A.; LUÍS, D.; SANTOS, S.; SILVA, J.; MENDO, A. S.; COITO, L.; SILVA, T. F. S.; GUEDES DA SILVA, M. F. C.; MARTINS, L. M. D. R. S.; POMBEIRO, A. J. L.; BORRALHO, P. M.; RODRIGUES, C. M. P.; CABRAL, M. G.; VIDEIRA, P. A.; MONTEIRO, C.; FERNANDES, A. R. Biological characterization of the antiproliferative potential of Co(II) and Sn(IV) coordination compounds in human cancer cell lines: A comparative proteomic approach. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 167–176, 2013.

SONAK, S. Implications of organotins in the marine environment and their prohibition. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 90, n. SUPPL. 1, p. 1–3, 2009.

SONAK, S.; PANGAM, P.; GIRIYAN, A.; HAWALDAR, K. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 90, n. SUPPL. 1, p. 96–108, 2009.

SOUSA, A. C. A.; PASTORINHO, M. R.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 117–137, 2014.

STRANGE, R.; WESTERLIND, K. C.; ZIEMIECKI, A.; ANDRES, A. C. Proliferation and apoptosis in mammary epithelium during the rat oestrous cycle. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 137–149, 2007.

SUBBARAMAIAH, K.; HOWE, L. R.; BHARDWAJ, P.; DU, B.; GRAVAGHI, C.; YANTISS, R. K.; ZHOU, X. K.; BLAHO, V. A.; HLA, T.; YANG, P.; KOPELOVICH, L.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer Prevention Research**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 329–346, 2011.

SYAM, S.; BUSTAMAM, A.; HASHIM, N. M.; GHADERIAN, M.; HOBANI, Y. H.; MAKEEN, A.; ABDELWAHAB, S. I.; MOHAN, S. Corrigendum to "β-Mangostin suppresses LA-7 cells proliferation in vitro and in vivo : Involvement of antioxidant enzyme modulation; suppression of matrix metalloproteinase and α6β4 integrin signaling pathways" [J. Funct. Foods 22 (2016) 504–517]. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 34, p. 478–479, 2017.

TALANTI, S.; HOPUSU, V. K. Leucine Aminopeptidase in the Mammary Gland of the Cow and Rat. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 181, p. 85–87, 1961.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TURNER, A.; COMBER, S.; REES, A. B.; GKIOKAS, D.; SOLMAN, K. Metals in boat paint fragments from slipways, repair facilities and abandoned vessels: An evaluation using field portable XRF. **Talanta**, [s. l.], v. 131, p. 372–378, 2015.

VANDENBERG, L. N.; COLBORN, T.; HAYES, T. B.; HEINDEL, J. J.; JACOBS, D. R.; LEE, D.-H.; SHIODA, T.; SOTO, A. M.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; ZOELLER, R. T.; MYERS, J. P.; MYERS, J. P. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 378–455, 2012.

WESTWOOD, F. R. **The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging**, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tributyltin compounds** (WHO, Ed.) **Environmental health criteria**. Geneva: WHO, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. 2010. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf)>.

YOUNG, A. N.; MOYLE-HEYRMAN, G.; KIM, J. J.; BURDETTE, J. E. Microphysiologic systems in female reproductive biology. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 242, n. 17, p. 1690–1700, 2017.

YU, Q. C.; VERHEYEN, E. M.; ZENG, Y. A. Mammary development and breast cancer: A Wnt perspective. **Cancers**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–26, 2016.